



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554801_0086

Aus dem Institut für Zoologie und Hydrobiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. M. Ruf
Prof. Dr. W. Ahne

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Dr. habil. R. Hoffmann

ZUR PATHOGENESE DER GLOMERULONEPHRITIS BEI REGENBOGEN-
FORELLEN (SALMO GAIRDNERI) MIT BAKTERIELLER
NIERENKRANKHEIT (BKD).*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Susanne Sami
aus
Shubra/Kairo

München 1989

*Die Untersuchungen wurden durch das Bundesministerium für
Ernährung, Landwirtschaft und Forsten dankenswerterweise
unterstützt.

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. R. Hoffmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Gropp

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit

I. Einleitung

II. Literaturbesprechung

1.	Die Bakterielle Nierenkrankheit (BKD) der Salmoniden	2
1.1.	Definition	2
1.2.	Vorkommen und Verbreitung	2
1.3.	Ätiologie	4
1.4.	Übertragungsmodus	6
1.5.	Die Empfindlichkeit beeinflussende Faktoren ...	7
2.	Symptomatologie der BKD	9
2.1.	Klinische Symptome	9
2.2.	Pathologisch-anatomische Veränderungen	11
2.3.	Histopathologische Veränderungen der Niere bei BKD	13
2.3.a.	Lichtmikroskopie	13
2.3.b.	Elektronenmikroskopische Veränderungen	15
3.	Nierenveränderungen anderer Genese bei Salmoniden	18
4.	Diagnose	22
4.1.	Direkter Nachweis von <u>Renibakterium salmoninarum</u>	22
4.1.a.	Bakterienfärbung von Organabklatsch- und Schnittpräparaten	22
4.1.b.	Anzüchtung des Erregers	23
4.1.c.	Doppelimmunodiffusion nach Ouchterlony	25
4.1.d.	Immunfluoreszenz-Technik	25
4.1.e.	Counter-Immunelektrophorese	26
4.1.f.	Koagglutinationstest	27
4.1.g.	Latex-Agglutinationstest	27

4.1.h.	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA)	27
4.1.i.	Andere Immun-Enzym-Bestimmungsmethoden	28
4.2.	Nachweis von Antikörpern gegen <u>Renibacterium</u> <u>salmoninarum</u>	29
4.2.a.	Agglutinationstest	29
4.2.b.	Hämagglutinationshemmungsreaktion	30
5.	Das Immunsystem und andere Abwehrmechanismen der Teleosteen	31
5.1.	Immunsystem	31
5.2.	Abwehrmechanismen	32
5.2.a.	Unspezifische Abwehrmechanismen	32
5.2.b.	Spezifische Abwehrmechanismen	33
6.	Immunkomplex-Glomerulonephritis	36
6.1.	Immunkomplex-Glomerulonephritis der Mammalia ..	36
6.2.	Immunkomplex-Glomerulonephritis der Fische ...	40
6.3.	Pathogenese der Immunkomplex-Glomerulo- nephritis	42
6.3.a.	Die Rolle zirkulierender Immunkomplexe bei der Pathogenese der Immunkomplex-Glomerulo- nephritis	43
6.4.	Histopathologie der Immunkomplex-Glomerulo- nephritis	44
6.5.	Elektronenmikroskopie	45

III. Eigene Untersuchungen

1.	Material	47
1.1.	Versuchstiere	47
2.	Methoden	47
2.1.	Sektion	47
2.2.	Histologische Untersuchungen	48
2.2.a.	Lichtmikroskopie	48

2.3.	Elektronenmikroskopie	48
2.3.a.	Semidünnschnitte	49
2.3.b.	Ultradünnschnitte	49
2.4.	Immunkomplex-Nachweis im Gewebe	50
2.4.a.	Indirekte Immunfluoreszenz-Technik (IFT) an Kryostatschnitten	50
2.4.b.	Indirekte Immunfluoreszenz-Technik (IFT) an Paraffinschnitten	51
2.5.	Nachweis von <u>Renibacterium salmoninarum</u>	51
2.5.a.	Erregeranzüchtung	51
2.5.b.	Indirekte Immunfluoreszenz-Technik (IFT) am Organabklatsch	52
2.6.	Hämagglutinationshemmungsreaktion (HAH)	53
3.	Ergebnisse	
3.1.	Klinische Symptome und Autopsie	54
3.2.	Pathohistologie	54
3.2.a.	Lichtmikroskopie	54
3.2.b.	Elektronenmikroskopie	62
3.3.	Nachweis von Immunglobulinen mittels indirekter Fluoreszenz-Technik	70
3.3.a.	Im Kryostatschnitt der Niere	70
3.3.b.	Im Paraffinschnitt der Niere	71
3.4.	Nachweis von <u>Renibacterium salmoninarum</u>	71
3.5.	Nachweis von HAH-Antikörpern gegen Renibac- terium salmoninarum im Serum von Versuchs- und Kontrollfischen	72
IV.	Besprechung der Ergebnisse	73
V.	Zusammenfassung	81
	Summary	82
VI.	Literaturverzeichnis	83
	Lebenslauf	

1. Einleitung

Die Bakterielle Nierenkrankheit der Salmoniden (Bacterial Kidney Disease = BKD) ist eine weit verbreitete Infektion der Salmoniden. Sie verläuft klinisch akut oder subakut, meist aber chronisch. Während bei akutem Verlauf hauptsächlich Manifestationen an den Augen und der Haut oder Läsionen innerer Organe, vor allem der Niere, festgestellt werden, liegen beim chronischen Verlauf häufig Veränderungen des Nephrons vor, die der Glomerulonephritis der Säuger ähnlich sind.

Ziel vorliegender Arbeit ist die Klärung der Pathogenese dieser Glomerulonephritis bei der chronischen BKD der Regenbogenforelle (Salmo gairdneri) an Hand histologischer, elektronenmikroskopischer und immunhistologischer Untersuchungen.



II. Literatur

1. Die Bakterielle Nierenkrankheit (BKD) der Salmoniden

1.1. Definition

Von allen bakteriellen Infektionen der Salmoniden ist die BKD eine der wirtschaftlich bedeutendsten. AUSTIN und RAYMENT (1985) sehen sie als eine ernsthafte Gefahr für die Salmoniden in Wildwässern und in Teichwirtschaften an. BULLOCK et al. (1971) beschäftigten sich mit der historischen Benennung der BKD. Ihren Angaben zufolge wurden zuerst Krankheiten in den Vereinigten Staaten, Kanada sowie auf den Britischen Inseln gemeldet und als "Nierenkrankheit" beschrieben. Nach SMITH (1964) wurde dieselbe Krankheit auf den Britischen Inseln "Dee Disease" genannt. In der Folgezeit wurde die Bezeichnung "Nierenkrankheit" generell in Nordamerika und Europa verwendet (REICHENBACH-KLINKE, 1966). Als Erreger der BKD wurde ein Gram-positives, unbewegliches Stäbchen isoliert, das später als Renibacterium salmoninarum bezeichnet wurde (SANDERS und FREYER, 1980).

1.2. Vorkommen und Verbreitung

Die erste Beschreibung der BKD erfolgte 1930-33 in Schottland bei 15 wildlebenden Atlantischen Lachsen (Salmo salar) von MACKIE et al. (1933). Anschließend wurde das Vorkommen der Krankheit von zahlreichen Autoren in verschiedenen Ländern dokumentiert, und zwar in Kanada (PIPPY, 1969; EVELYN et al., 1973), den Vereinigten Staaten (BELDING und MERRILL, 1935; RUCKER et al., 1954), Frankreich (DE KINKELIN, 1974), Island (EVELYN, 1977), Italien (GHITTINO et al., 1977), Spanien (MILLAN, 1977), Jugoslawien (FIJAN, 1977), Japan (KIMURA und AWAKURA, 1977), Norwegen (BRUNO und MUNRO, 1982), Türkei (KLONTZ, 1982), Deutschland (Hoffmann et al., 1984), Chile und England (AUSTIN und AUSTIN, 1986).

BKD kommt bei fünf Fischgenera vor: Salvelinus, Salmo, Onco-
rhynchus, Thymallus und Hucho (SCHAUNER, 1986). Sie wurde
bei 17 Spezies der Salmoniden (SCHAUNER; 1986) in jedem Al-
ter (SNIEZKO et al., 1955), vom Brutbestand (WOLF und DUN-
BAR, 1959 b; FIJAN, 1977) bis zu Fingerlingen (RUCKER et
al., 1954) und über ein Jahr alten Fischen (FIJAN, 1977;
KIMURA und AWAKURA 1977) sowie bei Subadulten und Adulten
(KLONTZ, 1982) beobachtet. Eine wirtschaftliche Bedeutung
kommt der BKD nach MITCHUM et al. (1979) hauptsächlich bei
älteren Fischen zu.

EVELYN et al. (1981, 1984, 1986 a,b) gelang die Isolierung
des Erregers aus Eiern infizierter Salmoniden.

Der Erreger ist in den verschiedensten Gewässern nachgewie-
sen worden, und zwar einerseits in Salzwasser (EARP et al.,
1953; BELL, 1961; ELLIS et al., 1987) z. B. aus den Pazifi-
schen oder Atlantischen Ozean (SMITH, 1964; PIPPY, 1969
und BANNER et al., 1986) sowie in anderen Meeren (BELL,
1961) und andererseits in Süßwasser (SMITH, 1964), wie Flüs-
sen und Seen (AUSTIN et al., 1983; PFEIL-PUTZIEN et al.,
1985 b).

Obwohl die meisten Berichte über BKD von Teichwirtschaften
und Fischfarmen stammen (BELDING und MERRILL, 1935; EARP et
al., 1953; RUCKER et al., 1954; BELL, 1961; WARREN, 1963 a;
PIPPY, 1969; YAMAMOTO, 1975; FRANTSI et al., 1975; LALLIER
et al., 1981; FRYER und SANDERS, 1981; KLONTZ, 1982; PFEIL-
PUTZIEN et al., 1985 b), ließ sich die Erkrankung auch bei
wildlebenden Salmoniden ermitteln (RUCKER et al., 1951, 1954;
WOOD und WALLIS, 1955; SMITH, 1964; PIPPY, 1969; MAC LEAN
und YODER, 1970; EVELYN et al., 1973; DE KINKELIN, 1974;
WOOD, 1974; FRANTSI et al., 1975; ELLIS et al., 1978; PATER-
SON et al., 1979, 1980, 1981; MITCHUM et al., 1979; MITCHUM
und SHERMAN, 1981; PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 a,b).

SMITH (1964) berichtete über ein vermehrtes Auftreten von
BKD im Frühling und Frühsommer, was von LALLIER et al.
(1981) bestätigt wurde.

1.3. Ätiologie

Das R. salmoninarum ist ein aerobes Bakterium. Sein Wachstum verläuft bei Temperaturen von 5 bis 22° C in vitro sehr langsam und findet nicht bei 30° C statt (GOODFELLOW et al., 1985). Als optimal für das Wachstum werden Temperaturen zwischen 15 und 18° C und ein pH-Wert zwischen 5,8 und 7,8 angegeben.

Auf Grund des pleomorphen Charakters des Erregers der BKD und seiner zellulären metachromatischen Granula wurde von ORDAL und EARP (1956) erstmals eine Verwandtschaft mit Corynebakterien vermutet. Für eine derartige Zugehörigkeit sprachen sich auch SMITH (1964), SANDERS und FRYER (1978) sowie AUSTIN und RODGERS (1980) aus. Letztlich wiesen aber YOUNG und CHAPMAN (1978) auf Grund von ultrastrukturellen Untersuchungen auf eine regelmäßige Stäbchenform des BKD-Erregers in Kultur hin und auf eine besondere Unregelmäßigkeit der Zellform, die im Wirtsgewebe beobachtet werden konnte. Diese variable Zellform zeichnet sich gelegentlich durch eine terminale Schwellung (Keulenform) aus, wie sie für Corynebakterien charakteristisch ist. Erst durch SANDERS und FRYER (1980) wurde auf Grund der biochemischen Zusammensetzung der Zellwand des BKD-Erregers seine Zugehörigkeit zu einem neuen Genus Renibacterium und zu der Spezies salmoninarum festgestellt. Inzwischen hat der Name Renibacterium salmoninarum gen. nov., sp. nov. allgemeine Gültigkeit erlangt.

Das R. salmoninarum ist ein kurzes (0,3 bis 1,0 x 1,0 bis 1,5 µm), Gram-positives, unbewegliches Stäbchen (DE KINLELIN, 1974; BULLOCK et al., 1975; GOODFELLOW et al., 1985), das oft in Paaren auftritt. Es bildet keine Sporen, besitzt keine Kapsel, ist nicht alkohol-säurefest, hat katalytische und proteolytische Aktivitäten (SMITH, 1964) und ist Zytochromoxidase-negativ (SANDERS und FRYER, 1980).

BRUNO und MUNRO (1986) zählten tabellarisch die biochemischen Eigenschaften des R. salmoninarum auf, die auf Grund

vergleichender Untersuchungen zahlreicher Isolate aus verschiedenen Erdteilen zusammengestellt wurden. Dabei wurden neue bis dahin unbekannte Eigenschaften beobachtet, und zwar DNase, hämolytische und proteolytische Aktivitäten, das Vorhandensein von Glykogen in den Zellen sowie negative Reaktionen in Testen auf Nitrate, Amylase, Tween 80-Hydrolyse, Gallenlöslichkeit, Arginin-Hydrolyse und Phosphatase. Dieselben Autoren konnten auch alle R. salmoninarum-Isolate als PAS-positiv ermitteln. Auch die Lipidwerte sowie ihre -zusammensetzungen (COLLINS, 1982 und EMBLEY et al., 1983) dienten zur Identifizierung des Genus Renibacterium. Nach COLLINS (1982) zeigten Methanolsate der ganzen Bakterienzelle, daß 12-Methyltetradecanoic-Säure (Anteiso-C₁₂) die hauptsächliche Fettsäure ist (59,0 %); auch 14-Methylhexadecanoic-Säure (Anteiso-C₁₇) ist in signifikanten Mengen (38,5%) vorhanden.

Die Bakterienzellwand enthält eine beträchtliche Menge an Polysacchariden, vor allem ist Galactose die wesentlichste Zuckerkomponente. Hinzu kommen N-acetyl-glycosamine, Rhamnose und N-acetyl-fucosamine (KUSSER und FIEDLER, 1983). Das an Hand einer automatischen Aminosäure-Analyse festgestellte Vorhandensein des Zuckers N-acetyl-fucosamine weist darauf hin, daß dieser ungewöhnliche Aminozyucker nicht nur als Zelloberflächenkomponente des Gram-positiven Bakteriums vorhanden ist; er gibt auch eine Erklärung für die pathogenetischen und serologischen Eigenschaften des R. salmoninarum. Nach FIEDLER und DRAXL (1986) charakterisieren zwei Zellwandkomponenten den Stammtyp ATCC 33209 des R. salmoninarum: Ein einzigartiges Peptidoglycan und ein ungewöhnliches, oben erwähntes Zellwand-Polysaccharid. Die Peptidoglycan-Zellwand enthält Alanin, Glycin, Glutaminsäure und Lysin als Diaminosäuren. Das Mol % Guanin und Cytosin (G+C) der DNA beträgt 53 und 54 (GOODFELLOW et al., 1985).

Das KD-Bakterium ist bislang in verschiedenen Organen infizierter Fische nachgewiesen worden, und zwar in der Niere (SANDERS und FRYER, 1980; AUSTIN et al., 1983; CIPRIANO et al., 1985; AUSTIN und RAYMENT, 1985; BRUNO und MUNRO, 1986), postorbitalem Gewebe (HENDRICKS und LEEK, 1975), Leber (LOBB, 1976), Darm und Hoden (PETERSON, 1982) und in Fischfäkalien (AUSTIN et al., 1983 und AUSTIN und RAYMENT, 1985). Es wurde ebenfalls aus Hautläsionen erkrankter Fische (MACLEAN und YODER, 1970; SANDERS und FRYER, 1980) und aus Eiern (ALLISON, 1958; BULLOCK et al., 1978; EVELYN et al., 1981, 1984, 1986 a,b) sowie aus Flußwasser isoliert (AUSTIN et al., 1983).

1.4. Übertragungsmodus

Die Übertragung von R. salmoninarum kann vertikal und horizontal erfolgen.

Die vertikale Infektion geschieht durch die Übertragung des R. salmoninarum über das Ei infizierter Salmoniden auf die Fischnachzucht und wurde neuerdings von EVELYN et al. (1984) dokumentiert. Die sich anschließende horizontale Infektion von Fisch zu Fisch (BELL et al., 1984) führt zu heftigen BKD-Ausbrüchen. Frühere Studien haben bereits die Eiübertragung des R. salmoninarum für die Verschleppung der BKD in viele Länder verantwortlich gemacht. So vermuteten z.B. GHITTINO et al. (1977), daß der Import infizierter Silberlachseier (Oncorhynchus kisutch) aus Nordamerika die Ursache der daran anschließend in Italien beobachteten BKD war. In Deutschland wurde jedoch das Vorkommen der BKD bei Salmoniden in offenen Wassersystemen, die keine klare Verbindung mit Fischen aus anderen Kontinenten hatten, beobachtet (PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 a). Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, daß das R. salmoninarum sowohl auf dem als auch im Ei übertragen wird (KLONTZ, 1982; EVELYN et al., 1986 a). Nach bisherigen Ergebnissen dürfte der männliche

Fisch keine Rolle bei der vertikalen Übertragung spielen (KLONTZ, 1982).

Für die horizontale Verbreitung ist der sogenannte Reservoir-Fisch bedeutungsvoll (SNIEZKO et al., 1955; EVELYN et al., 1973; FRANTSI et al., 1975; MITCHUM et al., 1979; SCHÄPERCLAUS, 1979; SNIEZKO, 1980; FRYER und SANDERS, 1981; LALLIER et al., 1981; MITCHUM und SHERMAN, 1981; KLONTZ, 1982; HOFFMANN et al., 1984). Als Erregerreservoir wurden bisher die chronisch infizierten weiblichen Salmoniden betrachtet (KLONTZ, 1982). Nach KLONTZ (1982) scheint R. salmoninarum in der Natur nicht frei überleben zu können und auch nicht im diskutierten Invertebraten-Wirt, obwohl beide als Reservoirpotentiale vermutet werden. Trägerfische scheiden den Erreger über den Kot in das Wasser aus. Empfängliche Fische nehmen den Erreger aus dem Wasser auf (SCHAUNER et al., 1985).

Über die Eintrittspforten der BKD gibt es viele Meinungen, so z. B. oral bei Verfütterung infizierter Organe (WOOD und WALLIS, 1955; HOFFMANN et al., 1984), durch Hautläsionen (WOLF und DUNBAR, 1959 b), Verletzungen an Körperteilen durch Parasiten (SNIEZKO et al., 1955; WOOD und YASUTAKE, 1956; SMITH, 1964; BULLOCK et al., 1971; COULSON, 1977; PUTZ, 1972). Der genaue natürliche Infektionsweg des Bakteriums über die Kiemen bzw. den Verdauungstrakt ist noch unklar (SCHAUNER et al., 1985).

1.5. Die Empfänglichkeit beeinflussende Faktoren

In der Literatur wurden zahlreiche Faktoren genannt, die das Angehen der Infektion bzw. das Auslösen der klinischen Manifestation bei chronischen Trägern zur Folge haben. Sie können in äußere und innere eingeteilt werden. Zu den letzteren gehört die Beeinträchtigung der Abwehr des Fisches durch Primärinfektionen viraler (YAMAMOTO, 1975) oder para-

sitärer Natur (WOOD und YASUTAKE, 1956). Ferner stellten MITCHUM und SHERMAN (1981) fest, daß die natürliche horizontale Übertragung der BKD von infizierten wildlebenden Bachsaiblingen (Salvelinus fontinalis) auf neu eingesetzte Bachsaiblinge, Bachforellen (Salmo trutta) und Regenbogenforellen (Salmo gairdneri) möglich ist. Eine anscheinend genetisch bedingte unterschiedliche Empfänglichkeit innerhalb der Salmonidenspezies wurde von mehreren verschiedenen Autoren beobachtet (BULLOCK et al., 1971; SANDERS et al., 1978; MITCHUM et al., 1979; SCHAPERCLAUS, 1979), wobei die Regenbogenforellen (S. gairdneri) und die Silberlachse (O. kisutch) die am wenigsten empfänglichen Fischarten waren. Die genauen Mechanismen dieses Phänomens sind noch nicht bekannt. Von SUZUMOTO et al. (1977) wurde über eine transferin-genotypabhängige Resistenz innerhalb der Silberlachse (O. kisutch) berichtet, wobei bei einer Erhöhung des Transferringehaltes im Fischblut den Bakterien das essentielle Eisen nicht mehr ausreichend zur Verfügung steht. Eine Erhöhung des Cortisonspiegels im Blut bei Stress, wie z. B. Umsetzen oder Transport (WARREN, 1963 a) oder zu hohe Besatzdichte (WEDEMEYER, 1976) führt über einen abwehrdepressiven Effekt zum Krankheitsausbruch.

An äußeren wirksamen Faktoren sind die Wassertemperatur (BELDING und MERRILL, 1935; SMITH, 1964; BULLOCK et al., 1971; KLONTZ, 1982), Wasserqualität wie Härte, Sauerstoffgehalt, Salzgehalt, Verschmutzung (WOLF und DUNBAR, 1959 a; WEDEMEYER, 1976; MITCHUM et al., 1979; FRYER und SANDERS, 1981; KLONTZ, 1982), die Futterzusammensetzungen (WOODALL und LAROCHE, 1964; WEDEMEYER und ROSS, 1973; WOOD, 1974; PATERSON et al., 1981 b; BELL et al., 1984; LALL et al., 1985) und die Haltungsbedingungen (Besatzdichte, häufiges Umsetzen, Transport) zu nennen.

Aus den vorhergehenden Daten ist zu folgern, daß die Züchtung widerstandsfähiger Salmonidenspezies wie auch die Aufzucht aus BKD-freien Eiern eine Bekämpfung der Krankheit ermöglichen könnte.

2. Symptomatologie

2.1. Klinische Symptome

Die Infektion mit dem R. salmoninarum ruft bei Salmoniden eine systemische, meist chronisch verlaufende Krankheit hervor, die in latent infizierten Fischen schwer nachzuweisen ist (SANDERS und FRYER, 1980; FRYER und SANDERS, 1981). Sie erzeugt bei Fischen unter sechs Monaten selten klinische Erscheinungen. RUCKER et al. (1954) berichten von heftigen Krankheitsausbrüchen bei älteren Tieren mit stark ansteigenden Mortalitätsraten. Die erkrankten Fische weisen Läsionen an Haut und Flossen auf (HOFFMANN et al., 1984). SNIEZKO et al. (1955) beschreiben eine Schwellung des Abdomen und der Analregion, Exophthalmus und Blasen an der Haut. Nach BULLOCK et al. (1971), IWAMA (1980) und HOFFMANN et al. (1984) ist der Exophthalmus die auffälligste klinische Erscheinung, die bei 30 und mehr Prozent der erkrankten Forellen beobachtet wird.

Exophthalmus, meist einseitig, konnte in 1-2 % der experimentell infizierten Fische beobachtet werden, jedoch ohne Anzeichen von Erblindenden. Dennoch gibt IWAMA (1980) zu erkennen, daß Exophthalmus und Melanose zusammen vermutlich keine symptomatischen Erscheinungen der BKD sind, sondern Zeichen eines ungewöhnlichen physikalischen Zustandes bei einjährigen Silberlachsen (Oncorhynchus kisutch). Dieser Ansicht ist auch WARREN (1983). Exophthalmus, der von MITCHUM und SHERMAN (1981) als "pop eye" bezeichnet wird, ist uni- oder bilateral. Ältere Fische können ein oder beide Augen verlieren (BELL, 1961; MAC LEAN und YODER, 1970; BULLOCK et al., 1971; HENDRICKS und LEEK, 1975; IWAMA, 1980; PETERSON et al., 1982; WARREN, 1983; SCHAUNER et al., 1985).

An stark infizierten Fischen werden Petechien (BELL, 1961; IWAMA, 1980) und hämorrhagische Bezirke entlang der Brustflossen (SMITH, 1964; BULLOCK et al., 1971; IWAMA, 1980) beobachtet. Melanose (IWAMA, 1980), Ulzera oder Abszesse

(FRYER und SANDERS, 1981; KLONTZ, 1982; HOFFMANN et al., 1984) gelten ebenfalls als äußere Kennzeichen der Krankheit.

Bei BKD werden auch biochemische Veränderungen im Blut festgestellt. Eine experimentelle Infektion von Regenbogenforellen (S. gairdneri) und Atlantischen Lachsen (S. salar) führt zu einer sichtlichen Senkung der Serumprotein- und der Cholesterinwerte sowie zu einem bedeutenden Anstieg des Blutharnstoff-Nitrogenspiegels (BRUNO, 1986). EARP et al. (1953) berichten, daß das KD-Bakterium vorwiegend im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit auch im Blutsystem vorgefunden wird. Die Erosionen und die Petechien an der Haut sowie die Hämorrhagien in verschiedenen viszerale Organen und Geweben sprechen für eine Schädigung des vaskulären Systems durch das Bakterium (IWAMA, 1980). Mit Hilfe des Dissektionsmikroskopes können kleine Läsionen an den Blutgefäßen der Schwimmblase nachgewiesen (IWAMA, 1980) werden.

HUNN (1964) beobachtet an infizierten Fischen einen um 44 % des Normalwertes verringerten Hämatokritspiegels, während das Gesamtplasmaprotein um 52 % reduziert ist. Eine elektrophoretische Analyse der Plasmaproteine zeigte (BRUNO, 1986), daß das Albumin quantitativ stark vermindert ist. Die serumanalytischen Werte stehen mit den charakteristischen Eigenschaften der Krankheit, wie Aszites, Zerstörung der hämopoetischen Zentren, Niereninsuffizienz, Reduzierung der Leberfunktion und den intrakutanen Hämorrhagien in enger Korrelation (BRUNO, 1986).

2.2. Pathologisch-anatomische Veränderungen

Von MITCHUM et al. (1979) durchgeführte Nekropsien zeigen, daß Häufigkeit und Ausmaß der makroskopischen Läsionen innerhalb ein und derselben Fischart (z.B. Salvelinus fontinalis, Salmo trutta, S. gairdneri) individuell sehr unterschiedlich sein können. So sind in den ersten Stadien äußerlich neben Hauterosionen und -geschwüren, Blasen an der Haut, Pusteln an den Seitenlinien und masernartiger Flecken an den Körperseiten sowie Petechien und Hämorrhagien um den After und die Brustflossen zu beobachten (WOOD und WALLIS, 1955; SMITH, 1964; SCHAUNER et al., 1985). Die Blasen enthalten meist eine klargelbe oder trübe Flüssigkeit, die Gewebezellen und den Erreger enthält. SNIEZKO et al. (1955) berichten, daß praktisch bei allen Fischen, ohne Einschränkung, die Analregion geschwollen ist und eine eitergelbe Flüssigkeit bei ganz leichtem Druck am After ausgeschieden wird. Keine Seltenheit sind kleine ulzerative Stellen an der Bauchfläche, welche nicht penetrierten.

An Stelle der Pusteln können gelegentlich Abszesse beobachtet werden, die mit einer dicklichen weißen oder hämorrhagischen Flüssigkeit angefüllt, tief im Muskelgewebe lokalisiert sind (BULLOCK et al., 1971).

Punktförmige bis flächenartige Hämorrhagien können in der Muskulatur vorkommen und sich bis in die das Peritoneum umgebenden Muskeln ausbreiten (SMITH, 1964; Peterson, 1982). Manchmal bedecken petechiale Hämorrhagien auch die Schwimmblase. Nach IWAMA (1980) macht letztere einen getrübbten Eindruck.

BULLOCK et al. (1971) stellen bei 15 % der von ihnen untersuchten, an BKD erkrankten Regenbogenforellen (S. gairdneri) Blutungen in Hoden und Eierstöcken fest.

Über die Ursache des Exophthalmus werden verschiedene Ansichten vertreten. Einerseits werden Ödem und seröse Infusion, die durch die Nierenschädigung bedingt sind, als Ursache vermutet. Andererseits wird berichtet, daß der Exophthalmus einer osmotisch regulierenden Wirkung unterliege.

Auch eine Flüssigkeitsansammlung hinter dem Augapfel wird ursächlich angenommen. Während der Endphase der Krankheit kann sich ein granulomatöses Gewebe hinter dem Augapfel ansammeln, das sich zu einer postorbitalen grauweißen Gewebemasse mit einer geringen Menge blutig-eitriger Flüssigkeit heranbildet, welche zu degenerativen und nekrotischen Veränderungen der Augenmuskulatur sowie des Bulbus und zu einer Vorverlagerung des Auges und im Extremfall zum Verlust der Linse führt (BULLOCK et al., 1971; HENDRICKS und LEEK, 1975; WARREN, 1983).

Oftmals wird eine trübe Flüssigkeit um das Herz oder eine blutigtrübe bis gelbbraune Flüssigkeitsansammlung um das Pericard beobachtet. Man findet Erosionen am Herzen oder Anzeichen einer Perikarditis, oft auch einer chronischen Myokarditis (BULLOCK et al., 1971; WARREN, 1983). SNIEZKO et al. (1955) beobachten bisweilen eine durchsichtige Pseudomembran, die Herz und Milz umschließt.

Von SMITH (1964) wurden in schottischen Lachsen zwei pathologische Formen gefunden, und zwar: (a) Bei einer Wassertemperatur von über 9,44° C eine nekrotische Form, die durch nekrotische Herde in Milz, Leber und Niere charakterisiert ist und (b) bei einer Wassertemperatur von unter 8,33° C eine membranöse Form, die durch die Bildung von Pseudomembranen auf Milz und Leber ausgezeichnet ist.

Die Leber weist weiße Läsionen, nekrotische Herde und Abszesse verschiedener Größe und Anzahl auf. Die geschwollene Milz zeigt ebenfalls weiße Herdchen wie in der Leber sowie cremig-weiße Läsionen mit einem Durchmesser von 4 mm. Diese können sowohl von harter und körniger als auch von weicher Konsistenz sein und geben der Milz ein pfefferartiges Aussehen (SMITH, 1964).

Bei der Autopsie werden regelmäßig erhebliche pathologische Veränderungen der Nieren beobachtet, die der Krankheit ihren Namen gaben. Während eines frühen Krankheitsstadiums bilden sich ein oder mehrere kleine grauweiße Bezirke, die unterhalb der ventralen Seite der Nierenkapsel beobachtet werden können (BULLOCK et al., 1971; SANDERS und FRYER, 1980). Bei

den im fortgeschrittenen Stadium verendeten oder getöteten Fischen werden Nierenschwellungen, auffallende Blässe, Ödem- bildung, sowie Nekrosen unterschiedlicher Größe und Anzahl, die der Niere ein graues, runzeliges Aussehen verleihen, be- schrieben. BELL (1961) und WARREN (1983) beobachteten zusätz- lich zystenartige Erscheinungen unterschiedlicher Ausbrei- tung und Menge, vor allem in der kaudalen Nierengegend (Rumpfniere).

Außerdem werden Aszites, Peritonitis und Enteritis festge- stellt (FIJAN, 1977).

Die Reproduktionsorgane scheinen von dem Erreger ebenfalls nicht ausgespart zu werden. PETERSON (1982) bezeichnet sogar die Hoden als Zielorgan für diesen Erreger und erst dann folgen Niere und Leber.

2.3. Histopathologische Veränderungen der Niere

2.3.a. Lichtmikroskopie

Bei BKD wurden in allen untersuchten Organen und Geweben vorwiegend aus Zellen mesenchymaler Herkunft aufgebaute Gra- nulome beschrieben, die intra- und extrazellulär gelagerte Bakterien und gelegentlich Riesenzellen enthielten und das ortsständige Gewebe verdrängten. BELDING und MERRILL stell- ten schon im Jahre 1935 bei 100 % der Bachsaiblinge (Salve- linus fontinalis) und der Europäischen Seeforellen (Salmo trutta lacustris) mikroskopische Veränderungen in der Niere fest. Bei einjährigen Bachsaiblingen (S. fontinalis) und de- ren Fingerlingen, einjährigen Silberlachsen (Oncorhynchus kisutch) und einjährigen Königslachsen (O. tshawytscha) so- wie bei Atlantischen Lachsen (S. salar) wurden von WOOD und YASUTAKE (1956) sowie von SMITH (1964) Granulome zwischen den Tubuli beobachtet, die oft von einer großen Anzahl Reni- bakterien umgeben waren.

Histologische Veränderungen der Niere fanden sich auch bei klinisch gesunden Fischen z. B. Äschen (Thymallus thymallus) (KETTLER et al., 1986).

Pathologische Veränderungen finden sich bei BKD sowohl in der Kopf- wie in der Rumpfniere. Die intakte Nierenkapsel kann von einer undurchsichtigen Membran, die Makrophagen und Renibakterien enthält, bedeckt sein. SMITH (1964) beschreibt, daß diese Membran bei Atlantischen Lachsen (Salmo salar) aus drei Schichten, nämlich aus einer äußeren Lage aus Fibrin, kernhaltigen Zellen und Bakterien, aus einer mittleren aus degenerierten und phagozytierten Leukozyten und aus einer inneren Schicht aus Fibroblasten und Histiozyten, aufgebaut ist. In der Subserosa der Niere können zusätzlich gut vaskularisierte Bindegewebszubildungen vorkommen, in denen reichlich Makrophagen und Bakterien enthalten sind.

Nach YASUTAKE (1975) und BRUNO (1986) beginnt der krankhafte Prozess in der Kopfniere mit einer Hyperplasie der Hämoblasten und einer Abnahme der Lymphozyten. Bald erscheinen Leukozyteninfiltrate und Makrophagenherde, die phagozytierte Bakterien enthalten. Das normale Gewebe wird durch Granulome ersetzt. Bei Wild- und Feldfischen aus „verseuchten“ Gewässern werden von KETTLER (1987) weniger Granulome gefunden. Etwas verzögert werden identische Vorgänge im Interstitium der Rumpfniere beobachtet. Das exkretorische Gewebe fällt der Degeneration und der Nekrose anheim. Die Tubuli enthalten amorphe Zylinder. Melanomakrophagen sind vermehrt vorhanden (HOFFMANN et al., 1984). YOUNG und CHAPMAN (1978) finden in den Zellen der proximalen Tubulusabschnitte der erkrankten Regenbogenforellen (S. gairdneri) eosinophile Granula, die hyalinen Einschlüssen gleichen. Eingehendere histologische Untersuchungen der Nieren infizierter Äschen (Thymallus thymallus) von KETTLER (1987) ergaben, daß beim akuten Verlauf im blutbildenden Gewebe reichlich diffus oder herdförmig verteilte Makrophageninfiltrate auftreten, die intra- und extrazelluläre Gram- und PAS-positive Bakterien enthalten. Durch die PAS-Reaktion lassen sich braunschwarze

Pigmentgranula von den roten Bakterien unterscheiden. Makrophagenherde sind häufig von Bindegewebe und Lymphozyten umgeben. Selten sind Epitheloidzellen in Granulomfrühstadien anzutreffen, dagegen reichlich retikuläre Fasern im Interstitium. Schädigungen des exkretorischen Anteils der Rumpfniere sind durch Kapillardilatationen in den Glomerula, Erweiterung der Bowman'schen Kapsel durch einen eosinophilen oder leicht PAS-positiven homogenen oder feinstrukturierten Inhalt gekennzeichnet. Die kapillare Basalmembran kann verdickt sein. Eosinophile und PAS-positive Ablagerungen im Mesangium werden ebenso wie Endothelschädigungen in Glomeruluskapillaren beobachtet. In letzteren sind ebenfalls Bakterien, Makrophagen oder Thromben anzutreffen. Glomerulonekrosen sind ebenfalls vorhanden.

Die Tubuluszellen zeigen häufig degenerative Veränderungen, selten Nekrosen. Im Lumen der oft erweiterten Tubuli findet sich eine wabige, meist eosinophile, manchmal auch PAS-positive Substanz (KETTLER, 1987).

Bei chronischem Verlauf fällt die Reduktion des hämatopoetischen Gewebes auf. An seiner Stelle sind eosinophile hyaline Ablagerungen und Erythrozytenextravasate zu finden. Bakterien werden nur noch selten nachgewiesen. Eine Verquellung der Glomerula ist die Folge von Wandfibrosen, Endothelzellhypertrophie der Kapillaren und Ablagerungen von stark PAS-positivem Material in der kapillaren Basalmembran und im Mesangium. Partielle oder totale Nekrosen des Kapillarknäuels sind ebenso selten wie periglomeruläre Fibrosen. Tubulusepithelien zeigen vakuolige oder hyaline Degeneration und Fetteinlagerung sowie Nekrosen. Im Tubuluslumen liegt PAS-positives feinstrukturiertes Material.

2.3.b. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Elektronenmikroskopisch gelang es YAMAMOTO (1975) bei BKD-kranken Regenbogenforellen (S. gairdneri) und Bachsaiblingen (Salvelinus fontinalis) in Nierenpräparaten Bakterien extra-

und intrazellulär nachzuweisen, wobei er sowohl die Aufnahme der Bakterien durch Phagozytose als auch eine intrazelluläre Vermehrung durch Teilung vermutete. Beteiligt sind Makrophagen, Leukozyten und Pigmentzellen.

Diese Befunde werden durch die Untersuchungen von YOUNG und CHAPMAN (1978) und KETTLER (1987) bestätigt. Auch sie finden im intertubulären hämatopoetischen Gewebe intra- und extrazelluläre, elektronendichte kompakte Stäbchenbakterien mit zweischichtiger Zellwand. KETTLER (1987) unterscheidet drei phagozytierende Zelltypen: Eine makrophagenähnliche Zelle mit randständigem Kern und deutlichem Nukleolus, deren Zytoplasma mit Bakterien prall gefüllt ist; weiterhin einen Phagozyten mit elektronendichtem exzentrischem Kern und vielen Bakterien im Zytoplasma sowie letztlich Zellen mit großem lichten exzentrischem Kern mit randständigem Chromatin, undeutlichem Nukleolus und einem kleinblasigen elektronenlichten Zytoplasma, das nur einzelne Bakterien enthält. Bei allen drei Zelltypen ist das Plasma im Bereich der Bakterien elektronendichter, enthält geblähte Mitochondrien und bildet faserartige Strukturen. Um phagozytierte Bakterien herum finden sich in den Zellen myelineartige Figuren.

In den erheblich veränderten Glomerula befinden sich nach YOUNG und CHAPMAN (1978) im Zentrum Ansammlungen von Zellen mit unregelmäßigem elektronendichtem Zellkern. In elektronendurchlässigen Spalten sind fußähnliche Zellausläufer zu erkennen, die zahlreiche, unterschiedlich stark geschwollene Mitochondrien in ihrem Zytoplasma aufweisen. Die Wandstrukturen der Kapillaren sind in den Glomerula differenzierbar. Die Basalmembran zeigt eine unregelmäßige geringgradige Verdickung und Sprenkelung. Große unstrukturierte Verdickungen ragen aus den Endothelzellen hervor und in die Kapillarschlingen hinein, was zu einem Zellödem führt. Ödematöse Endothelzellen können dann das Lumen bei einer akuten Glomerulonephritis verschließen, während eine Fusion der fußähnlichen Zellausläufer an den viszerale Epithelzellen bei fast allen glomerulären Erkrankungen zu finden ist. Während YOUNG und CHAPMAN (1978) von spärlichen bis reichlichen sub-

endothelialen und mesangialen elektronendichten Ablagerungen und von Proliferationen des mesangialen Gewebes und einer Verdickung der Basalmembran in Glomerulaschlingen berichten, werden diese Befunde von KETTLER (1987) nicht bestätigt. Sie sieht im Zytoplasma von Endothelzellen elektronendurchlässige Vakuolen, aber im Gegensatz zu YOUNG und CHAPMAN (1978) keine Veränderungen der Basalmembran der Bowman'schen Kapsel. Subendotheliale Ablagerungen können einen Antigen-Antikörper-Komplex darstellen, während eine verdickte unregelmäßige Basalmembran bei einer Glomerulonephritis oft in Zusammenhang mit einer Proteinurie (CHURG, 1968) steht. Die veränderten Glomerula sind sowohl bei experimentell als auch bei natürlich infizierten Fischen anzutreffen.

Die Tubulusepithelzellen enthalten keine Bakterien, aber besonders solche im basalen Bereich haben Anzeichen einer hydropischen Degenerationen und geschwollenen teilweise geplatze Mitochondrien; auch myelinartige Strukturen kommen darin vor. Im Endstadium sind die Tubuli terminal irreversibel geschädigt. Geplatze Mitochondrien, Lysosomen- und Zellkernstrukturveränderungen sowie Unterbrechung des Bürstensaumes und der Basalmembran des Plasmalemmas sind charakteristisch. Im proximalen und distalen Bereich sind erweitertes endoplasmatisches Retikulum sowie Ablagerungen von Kollagen an basalen Tubuluszellwänden festzustellen. In unmittelbarer Nähe befinden sich Fibroblasten mit gut ausgebildetem, granuliertem endoplasmatischem Retikulum und dem Golgi-Apparat.

In interstitiellen Blutlakunen sind mit Bakterien enthaltende Zellen anzutreffen. Außerdem sind im Interstitium mehrere Schichten Fibrozyten mit peripherem elektronendichtem Zellkern zu beobachten, welche im Zentrum, im Gegensatz zu den vielgestaltigen Zellen in den Randzonen, langgestreckt erscheinen. Die vorhandenen Granula sind gleichmäßig rund, von unterschiedlicher Größe und meist homogen elektronendicht. Neben einem Melanomakrophagen erscheinen sie deutlich heller. Der Zellkern ist elektronendicht und polymorph. Das In-

terstitium im Randgebiet der periglomerulären Fibrosen enthält in großen Mengen Kollagenfibrillen. In Fibroblasten und anderen Zellen des interstitiellen Gewebes befinden sich fettähnliche Tröpfchen.

Dieses elektronenmikroskopische Bild ähnelt nach YOUNG und CHAPMANN (1978) sowie KETTLER (1987) sehr stark den Nierenveränderungen der Säugetiere beim Vorliegen einer Proteinurie, eines nephrotoxischen Syndroms bzw. einer Glomerulonephritis.

3. Nierenveränderungen anderer Genese bei Salmoniden

Außer der BKD kommen bei Salmoniden eine Reihe von Krankheiten verschiedener Genese vor, die unter anderem auch zu pathologisch-anatomischen Veränderungen der Niere führen und die differentialdiagnostisch durch den Erregernachweis abzugrenzen sind. In folgender Übersichtstabelle sind diese Nierenveränderungen zusammenfassend dargestellt. (Tab. 1)

Tabelle 1: Nierenveränderungen unterschiedlicher Genese bei Salmoniden

Krankheit/Erreger	Nierenveränderungen	Autor(en)
<u>Viruskrankheiten:</u>		
Virale Hämorrhagische Septikämie (Rhabdovirus)	Chronische Form: Starke Schwellung der Niere, oft mit gewellter Oberfläche, nekrotische Nierentubuli sowie erhebliche Reduktion des hämopoetischen Gewebes; Nekrose der Melanomakrophagenzentren; Pigmentschwund, Ödem und Hyperplasie des interstiellen granulolymphopoetischen Gewebes; massive endotheliale Defekte und Zerstörungen der Arterienwand der Kopfniere; große elektronendichte subendotheliale und mesangiale Ablagerungen.	AMLACHER (1986) ELGER et al. (1986) ELGER und HENTSCHEL (1983)
Infektiöse Hämatopoetische Nekrosen (Rhabdovirus)	Petechien und Dystrophie des kaudalen Nierenteils; hämatopoetisches Gewebe mit ausgedehnten Nekrosen	AMLACHER (1986)
<u>Bakterielle Krankheiten:</u>		
Furunkulose (<u>Aeromonas salmonicida</u>)	Blutung und Veränderungen des hämatopoetischen Gewebes im Pronephronbereich (Hämorrhagische Form).	AMLACHER (1986)
Fischtuberkulose (<u>Mycobacterium piscium</u>)	Miliare Tuberkel; käsige, Nekroseherde; tuberkulöse Granulome; Nekrose der Tubuli.	AMLACHER (1986)

Tabelle 1 (Fortsetzung 1)

<u>Krankheit/Erreger</u>	<u>Nierenveränderungen</u>	<u>Autor(en)</u>
Nokardiose (<u>Nocardia asteroides</u> <u>N. kompach</u>)	Schwellung; verkäste Herde.	GHITTINO et al. (1977); AMLACHER (1986)
Hitra-Krankheit (<u>Vibrio Sp.</u>)	Schwellung, Hämorrhagien; Nekrose der Zellmembran und des Zytoplasmas der Tubuli- zellen sowie Auflösung der Tubuli; Glomerula und Lumina der Tubuli mit PAS-positivem Material gefüllt; Läsionen der Glomerula oft mit Erwei- terungen der Bowman'schen Kapsel verbunden; hämatopoe- tisches Gewebe spärlich und nekrotisch; Zahl der Melano- makrophagen in der Kopfniere reduziert (von 600/mm ² auf 350/mm ²).	SOLEIM (1985)
<u>Mykosen:</u>		
Ichthyosporidiose (<u>Ichthyophonus</u> <u>hoferi</u>)	Sandpapier Effekt durch bindegewebige Schrumpfung; chronische Entzündungs- vorgänge mit kleinzelliger Infiltration, Nekrose und Bindegewebeneubildung; an- schließend Granulombildung.	AMLACHER (1986)
Hefeartige Pilzin- fektionen (Blastomyzeten- ähnliche)	Nekrose des hämatopoeti- schen Gewebes und der Neph- ronen.	BENDELE und KLONTZ (1975)

Tabelle 1 (Fortsetzung 2)

<u>Krankheit/Erreger</u>	<u>Nierenveränderungen</u>	<u>Autor(en)</u>
Exophiala-Infektion (<u>Exophiala salmonis</u>)	Kleine Knötchen in der Rumpfniere; Granulombildung in der Rumpfniere, die dann die ganze Niere einbezieht.	LANGVAD et al., (1985)

Parasitäre Krankheit

Proliferative Nierenkrankheit (Protozoon unbekannter Art, möglich Myxozoa)	Vergrößerte Rumpfniere; Ascites, Protozoen im Nierengewebe; Massive Proliferation kleiner Lymphozyten um parasitenbefallene Makrophagen in der Rumpfniere, später in Kopfniere, Milz und Leber.	KLONTZ et al., (1986)
---	---	-----------------------------

Fütterungsbedingte

Krankheit

Gossypolhaltiges Futter	Schwellung der Basalmembran der Glomerula; Degeneration der Tubuli; Pigmentierung der Niere mit PAS-positivem, Fe-negativem Pigment, das grün bzw. braungelb bei Giemsa- bzw. H&E-Färbung erscheint; Ausgüsse und Pigment in den Lumina der Tubuli.	HERMAN (1970)
----------------------------	--	------------------

4. Diagnose

Die Diagnose der BKD beruht auf pathologisch-anatomischen, histologischen Befunden und auf dem Nachweis des Erregers bzw. der spezifischen Antikörper in infizierten Fischen.

4.1. Direkter Nachweis von Renibacterium salmoninarum

4.1.a. Bakterienfärbung von Organabklatsch- und Schnittpräparaten

Der Nachweis Gram-positiver Stäbchen bzw. von Diplokokken im Abklatschpräparat von verändertem Gewebe bildet eine einfache und schnelle Methode zum Nachweis des KD-Erregers und wird von zahlreichen Autoren empfohlen (BELDING und MERRILL, 1935 ; EARP et al., 1953; RUCKER et al., 1954; SNIEZKO et al., 1955; BELL, 1961; SMITH, 1964; PIPPY, 1969 und von EVELYN et al., 1973; GHITTINO et al., 1977; ELLIS et al., 1978; IWAMA und GREER, 1980; FRYER und SANDERS, 1981). Im Vergleich zu anderen Nachweisverfahren ist die Gramfärbung von Organabklatschpräparaten weniger empfindlich (KIMURA, 1978; PATERSON et al., 1979; BULLOCK et al., 1980; LAIDLER, 1980; KIMURA und YOSHIMIZU, 1981^{a,b}; LALLIER et al., 1981). Bei geringer Bakterienzahl ist sie als unsicher anzusehen (SCHAPERCLAUS, 1979). So stellten BULLOCK et al., (1980) fest, daß für eine optimale Auswertung mindestens 10^4 - 10^7 Bakterien pro Abklatsch vorhanden sein müssen. Nach KLONTZ (1982) eignet sich diese Methode nur dazu, in kürzester Zeit eine Verdachtsdiagnose zu stellen.

Die direkte Bakterienfärbung ist auch an histologischen Schnittpräparaten möglich, jedoch handelt es sich dabei um keine allgemein übliche Methode. So färben WOOD und YASUTAKE (1956) mit einer modifizierten Wolbach's-Giems-Technik intra- wie extrazelluläre KD-Bakterien im histologischen Präparat rötlich-purpur an. BRUNO und MUNRO (1982) verwenden

bei Gewebeschnitten die Lillie's-Allochrom-Technik, bei der neben den Bakterien auch Kollagen, Fibrin, Amyloid und Muskelretikulin differenzierbar sind. Verschiedene modifizierte Gramfärbungsmethoden werden auch an histologischen Präparaten verwendet (HENDRICKS und LEEK, 1975; YOUNG und CHAPMAN, 1978; PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 a).

4.1.b. Anzüchtung des Erregers

Zahlreiche verschiedene Medien wurden im Laufe der Jahre erprobt und verwendet. EARP et al. (1953) hatten erstmals Erfolge mit der Isolierung und Kultivierung des Bakteriums aus Nierengeweben oder aus Geweben mit charakteristischen Läsionen auf frischem Gewebe oder Kükenembryonen. Subkulturen wurden in Medien durchgeführt, die koaguliertes Eiweiß enthielten. Jedoch gelang eine regelmäßige sichere Kultivierung erst bei Verwendung eines Blut-Cystein-Agarmediums, das von ORDAL und EARP (1956) schon für die Anzüchtung eines ähnlichen Bakteriums verwendet worden war. Das Medium wurde von EVELYN (1977) als KDM1 bezeichnet. SMITH (1964) gelang jedoch eine Isolierung von R. salmoninarum weder auf Löffler's koaguliertem Serum noch auf dem Dorset-99-Eimedium noch auf einem Meerwasser-Ei Medium. BULLOCK et al. (1974) führten vergleichende Untersuchungen über das Wachstum von 10 BKD-Isolaten auf 4 verschiedenen Medien durch und stellten fest, daß das mit 0,1 % L-Cystein-Hydrochlorid supplementierte Mueller-Hinton (MH) Medium von WOLF und DUNBAR (1959 b) die größte Ernte erbrachte. 1977 berichtete EVELYN über ein verbessertes Wachstumsmedium (KDM2), welches wiederholt mit verschiedenen KD-Stämmen getestet wurde (EHLINGER, 1963; BULLOCK und STUCKEY, 1975; GHITTINO et al., 1977; SUZUMOTO et al., 1977; ELLIS et al., 1978; AUSTIN und RODGERS, 1980; BRUNO und MUNRO, 1982). Es erwies sich schließlich als das geeignetste Medium im Vergleich zu KDM1 und MH-Medium. Das KDM2 beinhaltet Serum statt Blut. Optimale Voraussetzungen für das Wachstum waren ein pH-Wert von

6,5 - 7,5 für das Medium und eine Inkubationstemperatur von 15° C (EVELYN, 1977). KDM2, eines der gebräuchlichsten Nährböden, setzt sich zusammen aus: Pepton 1,0 % (w/v), Hefe Extrakt 0,05 % (w/v), Cystein-Hydrochlorid 0,1 % (w/v), fötalem Kälberserum 20 % (v/v) und Agar 1,5 % (w/v). Bei Verwendung eines Mediums vergingen gewöhnlich 4 - 10 Tage, bis R. salmoninarum sichtbare Kolonien bildete. Jedoch konnte das Wachstum auch 3 - 5 Wochen in Anspruch nehmen, wenn es sich um sehr verdünnte Inokula handelte. Die weiß bis cremiggelben Kolonien erschienen auf dem KDM2-Medium rund und konvex und waren von variabler Größe. AUSTIN et al. (1983) entwickelten durch Beigabe einer Kombination antimikrobieller Präparate (Cycloheximid, D-Cycloserin, Polymycin B-Sulfat und Oxolinsäure) zum KDM2 einen Selektiv-KDM (SKDM). Dadurch wurde eine verbesserte selektive Isolierung des R. salmoninarum erreicht. Das Medium eignet sich besonders für ökologische sowie epidemiologische Untersuchungen. GOODFELLOW et al. (1985) beobachteten innerhalb von 15 Tagen ein erfolgreiches Wachstum des KD-Bakteriums auf einem 'semi-defined' Medium (SDM) nach EMBLEY et al. (1982). Auf diesem erschienen die Kolonien leicht erhaben, glatt, glänzend und cremiggelb gefärbt. DALY und STEVENSON (1985) berichteten über ein neues Wachstumsmedium (KDM-C) für R. salmoninarum, das Holzkohle enthielt; letztere wurde als ein effektiver Ersatz für das Serum in dem Medium vorgeschlagen.

Andererseits stellten EVELYN et al. (1981) fest, daß sich in Nierenhomogenaten infizierter Sockey-Lachse (Oncorhynchus nerka) wasserlösliche, enzymartige, antibakterielle Faktoren befinden, die das KD-Bakterium im Wachstum hemmen. Um bessere Isolierungsergebnisse zu erhalten, empfiehlt es sich daher, Nierenhomogenate vor einem Anzüchtungsversuch in Peptonwasser zu waschen oder stark zu verdünnen.

4.1.c. Doppelimmunodiffusion nach Ouchterlony

Die Immunodiffusion im Agar-Gelmedium nach Ouchterlony (1958, 1962) wurde von BULLOCK et al. (1974) und CHEN et al. (1974) in Form einer Makromethode zum Nachweis von KD-Bakterien in Organmaterial verwendet. Das Verfahren erwies sich als schnelle und spezifische Nachweismethode für die BKD (CHEN et al., 1974; KIMURA, 1978; SCHÄPERCLAUS, 1979; FRYER und SANDERS, 1981; KLONTZ, 1982). Ein Vergleich der Immunodiffusion mit anderen diagnostischen Verfahren (klinisches Bild und Gramfärbung von Organabklatschpräparaten) ergab bei vier Salmonidenarten gleiche Ergebnisse (KIMURA, 1978).

Mit einer Mikromethode des Immunodiffusionstestes erzielten KIMURA und YOSHIMIZU (1981 a,b) mit anderen Methoden vergleichbare Ergebnisse, wobei sich nur ein Koagglutinationsverfahren (siehe 3.1.f) empfindlicher als die Immunodiffusion erwies. CIPRIANO et al. (1985) fanden die Immunodiffusion nicht sehr hilfreich für den Nachweis des R. salmoninarum in asymptomatisch infizierten Fischen.

4.1.d. Immunfluoreszenz-Technik (IFT)

Die Immunfluoreszenz-Technik mit ihren direkten und indirekten Methoden fand auch Eingang in die BKD-Diagnostik. Sie ermöglicht sowohl die Sichtbarmachung von Antigenen unterschiedlicher Größe als auch den Nachweis spezifischer Antikörper (TIZARD, 1987).

Bei der direkten IFT wird das antigenhaltige Material direkt mit einer Lösung des markierten Antikörpers behandelt. BULLOCK und STUCKEY (1975) sowie BULLOCK et al. (1980) erprobten die direkte und indirekte IFT für den Nachweis des R. salmoninarum an formalininaktivierten Bakterienausstrichen und an Organabklatsch- bzw. Kotausstrichpräparaten. Sie stellten die gleiche Empfindlichkeit bei beiden Methoden fest, jedoch benötigte die direkte Methode weniger Zeit. Ein Vergleich mit der Gramfärbung von Organabklatschpräparaten

im Feldversuch erbrachte eine wesentliche höhere Empfindlichkeit der direkten IFT; so waren 68 % der Nieren bei der direkten IFT positiv gegenüber 35 % bei der Gramfärbung. Nach KLONTZ (1982) können mit der direkten IFT bereits 10 Bakterien in einem Organabklatschpräparat erfasst werden.

Die indirekte IFT erweist sich bei Vergleichsuntersuchungen von FRYER und SANDERS (1981) zur Erkennung von Erregerträgern empfindlicher als andere diagnostische Hilfsmittel (klinisches Bild, Gramfärbung, Immunodiffusion, Koagglutination). Auch andere Autoren erzielten wesentlich bessere Ergebnisse mit der indirekten IFT als mit der Gramfärbung und der Erregeranzüchtung (PATERSON et al., 1980; LAIDLER, 1980; EVELYN et al., 1981; LALLIER et al., 1981; PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 a,b). Obwohl nach KLONTZ (1982) kein Unterschied in der Empfindlichkeit zwischen der direkten und indirekten IFT besteht, spielt die letztere eine größere Rolle in der BKD-Diagnostik (ROBERTS, 1978; MITCHUM et al., 1979; SCHÄPERCLAUS, 1979; PATERSON et al., 1979; LALLIER et al., 1981; HOFFMANN et al., 1984; PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 a,b).

4.1.e. Counter-Immunelektrophorese

Die Counter-Immunelektrophorese (CIE) ist nach CIPRIANO et al. (1985) eine modifizierte Immunodiffusionsmethode, wobei das Gewebe auf ein lösliches Antigen der KD-Bakterien untersucht wird. Die Autoren stellten bei Vergleichsuntersuchungen der diagnostischen Verfahren fest, daß die Empfindlichkeit des CIE gleich der des Koagglutinationstestes, jedoch höher als die der bakteriologischen Isolierung des Erregers, die der IFT und die der Gramfärbung ist. Der mit dieser Methode verbundene erhebliche Arbeitsaufwand ist aber erst bei größeren Problemengungen sinnvoll.

4.1.f. Koagglutinationstest

KIMURA (1978) sowie KIMURA und YOSHIMIZU (1981 a,b) beschrieben einen Koagglutinationstest zum Nachweis eines hitzeextrahierten Antigens von R. salmoninarum und von hitzebehandelten Bakterienzellen, wobei sich der Test als hochspezifisch erwies. Im Vergleich zu anderen Verfahren hat sich der Koagglutinationstest als eine relativ einfache Methode bewährt, deren Empfindlichkeit höher als die der Immunodiffusion und der Gramfärbung ist (KIMURA und YOSHIMIZU, 1981 a). FRYER und SANDERS (1981) stellten folgende Reihenfolge für die abnehmende Empfindlichkeit der Nachweisverfahren fest: indirekte IFT, Koagglutination, Immunodiffusion, klinisches Bild und Gramfärbung.

4.1.g. Latex-Agglutinationstest

Der Latex-Agglutinationstest wurde von MCCARTHY (1975) für die Erkennung von Aeromonas salmonicida Antigen im Fischgewebe beschrieben und wurde von SAKAI et al. (1987 a) in Verbindung mit anderen diagnostischen Verfahren zum Nachweis von R. salmoniarum verwendet. Dabei erwies sich dieser Test empfindlicher als die Gramfärbung bzw. die Immunodiffusion, jedoch weniger empfindlich als die Koagglutination, indirekte IFT und die Peroxidase-Antiperoxidase Methode.

4.1.h. Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA)

Für die Identifizierung von R. salmoninarum wurde ein ELISA-Test entwickelt (DIXON, 1986), der sich als eine schnelle und leicht durchführbare Methode erwies und sich für die Felddiagnose der BKD eignet. Das in diesem Test verwendete Immun-Gammaglobulin wurde an zwei kreuzreagierenden Bakterienstämmen absorbiert und mit alkalischer Phosphatase konjugiert. Dadurch gelang es, bei klinisch an BKD erkrankten

Fischen das R. salmoninarum in der Niere innerhalb von 30 Min. nachzuweisen. Bei Trägerfischen erwies sich jedoch die Erregeranzucht als aussagefähig (DIXON, 1986).

4.1.i. Andere Immun-Enzym-Bestimmungsmethoden

Neuerdings wurden Variationen des ELISA beschrieben und zum Nachweis des R. salmoninarum verwendet. So berichteten SAKAI et al. (1987 b) über eine Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) Methode, die als Dot-Blot- oder ELISA-Methode für Felduntersuchungen anwendbar ist. Dabei werden an Immunglobuline oder Antiglobuline konjugierte Enzyme verwendet, um spezifische Antigene in Gewebeschnitten zu identifizieren. Die Technik ähnelt der Immunfluoreszenz. Die Gewebeschnitte werden mit enzymmarkierten Antikörpern behandelt. Die Antigen-Antikörperbindung wird durch das Auftreten eines braunen Niederschlages am Ort der Antikörperbindung kenntlich. Die Technik hat einige Vorteile gegenüber der Immunfluoreszenz. Das Gewebe kann gefärbt werden, und die Betrachtung erfolgt mit dem Lichtmikroskop. Die am häufigsten verwendeten Enzyme sind alkalische Phosphatase, Meerrettich-Peroxidase und β -Galactosidase. Die Peroxidase-Antiperoxidase Methode erwies sich als spezifisch und wurde im Vergleich zu anderen diagnostischen Verfahren wie folgend beurteilt: 10-mal empfindlicher als die indirekte IFT, 10^3 x empfindlicher als die Latex-Agglutination und 10^4 x empfindlicher als jeweils die Immunodiffusion und die Gramfärbung.

In weiteren vergleichenden Untersuchungen über die Empfindlichkeit von verschiedenen Dot-Blot Methoden gegenüber direkten und indirekten Immunenzymverfahren bei der Verwendung von PAP oder Avidin-Biotin Peroxidase Complex (ABC) beobachteten SAKAI et al. (1987 b), daß die ABC Methode die empfindlichste war. Obwohl das direkte oder indirekte Immunenzymverfahren weniger empfindlich als die ABC oder PAP war, eigneten sich die zuletzt genannten Verfahren wegen ihrer

einfacheren Anwendung für Felduntersuchungen. Alle verwendeten Dot-Blot Methoden erwiesen sich empfindlicher als die indirekte Immunfluoreszenz bzw. die CIE.

Die Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) wurde auch zum Nachweis von Immunglobulin-Ablagerungen herangezogen (TIZARD, 1987).

4.2. Nachweis von Antikörpern gegen R. salmoninarum

4.2.a Agglutinationstest

Der Agglutinationstest wurde sowohl bei Untersuchungen über die Verbreitung verschiedener Bakterieninfektionen bei Salmoniden als auch zur Agglutininintiterbestimmung bei Vakzinationsversuchen verwendet (BULLOCK und SNIEZKO, 1969; KIMURA und AWAKURA, 1977; KIMURA, 1978; MCCARTHY und JOHNSON, 1982; HAHNEL et al., 1983). Bei der BKD wurde er als Objektträger-schnellmethode und als Mikrotitermethode durchgeführt.

Die erstgenannte Methode erwies sich als ein schneller, qualitativer Screening-Test, der von WEBER und ZWICKER (1979) sowie SCHAUNER (1986) zum Nachweis spezifischer Antikörper verwendet wurde, während die letztere als quantitative Methode von zahlreichen Autoren meist zur Bestimmung des Serumantikörpergehaltes bei Impfversuchen (EVELYN, 1971; BAUDIN-LAURENCIN et al., 1977; PATERSON et al., 1981 a,b), aber auch im Rahmen von epizootologischen Untersuchungen (BULLOCK et al., 1974; WEBER und ZWICKER, 1979; SCHAUNER, 1986) benutzt wurde. Obwohl der diagnostische Wert des Agglutinationstestes unbestritten blieb, stellten AMAND und JOHNSON (1984) den Aussagewert der Agglutinationstiterhöhe über die Belastbarkeit der Immunität in Frage. Nach BULLOCK et al., (1974) eignet sich der Agglutinationstest auch zur serologischen Identifizierung von Bakterienisolaten.

4.2.b. Hämagglutinationshemmungsreaktion (HAH)

SCHAUNER (1986) entwickelte einen Mikrotiter-HAH-Test, bei dem R. salmoninarum Schafer erythrozyten (Oxoid FSR 1053) in 1 %-iger Konzentration agglutinierten. Ihre Untersuchungsergebnisse zeigten, daß dieser Test mehr positive Reagenten bei Regenbogenforellen (S. gairdneri) als die Agglutinationsmethode nachwies und daß die Titer der HAH Antikörper nicht in direkter Relation zum Titer agglutinierenden Antikörpern auftraten. Ferner zeigten sie, daß der HAH eine empfindlichere und technisch besser auswertbare Methode als der Agglutinationstest ist. Der Test wurde von MÜLLER (1986) für Felduntersuchungen über die Verbreitung der BKD im Süden Baden-Württembergs erprobt. Dabei stellte er fest, daß 68,7 % der untersuchten Regenbogenforellen (738 Proben) positiv reagierten. Bei Bachforellen (S. trutta) wurde nur ein positiver Reagent gefunden. Seinen Untersuchungsergebnissen nach eignet sich die Agglutinationsreaktion für serologische Untersuchungen bei Bachforellen (S. trutta) besser als die HAH. Umgekehrt war die HAH die ergiebigere serologische Nachweismethode bei den Regenbogenforellen (S. gairdneri).

5. Das Immunsystem und andere Abwehrmechanismen der Teleosteen

5.1. Immunsystem

Bei den Teleosteen stellen Niere, Milz und Thymus die immunkompetenten Organe dar. Im Unterschied zu Säugern besitzen Fische kein Knochenmark, in dem multipotente Stammzellen vorhanden sind. Ein an Lympho- und Granulozyten reiches hämatopoetisches Gewebe befindet sich in weiten Teilen der Niere und der Milz (ELLIS, 1977). Im Gegensatz zum Knochenmark enthält das entsprechende Nierengewebe viele antikörperproduzierende Zellen und Phagozyten (SMITH et al., 1967; CHILLER et al., 1969 a; RIJKERS et al., 1980). Die Niere übernimmt demnach Funktionen sowohl des Knochenmarks als auch des Lymphgewebes der Mammalia (ELLIS, 1982). In der Niere der Salmoniden befinden sich viele Melanomakrophagen (ELLIS, 1977; AGIUS, 1979).

Nach MANNING et al. (1982) hat die Milz in den ersten Lebensmonaten bei Salmoniden vorwiegend blutbildende Funktion. Mit zunehmendem Alter entwickeln sich die rote und weiße Pulpa. In den Retikulinfasernetzen der ellipsoiden Kapillaren liegt das Retikuloendothelial-System (RES) der Milz, das eine Filterfunktion ausübt und lösliche Antigene abfängt (ELLIS, 1980; SECOMBES und MANNING, 1980; SECOMBES et al., 1980). Die Antigene werden den Melanomakrophagenzentren in der Milz wie auch in den Nieren zugeführt und von ihnen phagozytiert (ELLIS et al., 1976; AGIUS, 1980). Die Milz enthält auch antikörperproduzierende Zellen (SMITH et al., 1967; CHILLER et al., 1969 b; INGRAM und ALEXANDER, 1980; RIJKERS et al., 1980).

Wie bei höheren Vertebraten erfüllt der Thymus seine Funktion bis zur Geschlechtsreife des Fisches (ELLIS, 1977, 1982). Neben verschiedenen Subpopulationen von T-Lymphozyten können bei manchen Fischarten sowohl T- als auch B-Lymphozyten im Thymus vorkommen (SAILENDRI und MUTHUKKARUPPAN, 1975).

5.2. Abwehrmechanismen

Die Abwehrmechanismen der Fische sind wie diejenigen höherer Wirbeltiere sowohl zur unspezifischen als auch zur spezifischen Abwehr fähig, wobei den unspezifischen Mechanismen beim Fisch eine weitaus größere Rolle zugeschrieben wird (CORBEL, 1975; SCHÄPERCLAUS, 1979; MANNING et al., 1982).

5.2.a. Unspezifische Abwehrmechanismen

Die unspezifische Abwehr beruht auf physikalisch-chemischen, humoralen und zellulären Faktoren. Unter den physikalisch-chemischen Faktoren sind Körpertemperatur, Magensäure und die Schleimhaut mit ihren bakteriziden und fungiziden Eigenschaften zu nennen. Andererseits stellen natürliche Hämolyse (LIEFMANN, 1911), Hämagglutinine (HODGINS et al., 1967), Lysozyme (SCHÄPERCLAUS, 1979) sowie Properdin und Komplement (CUSHING, 1945) im Serum die unspezifischen humoralen Faktoren dar. Außerdem wurde die Existenz von Interferon sowohl in vitro an Fischzellen (GRAVELL und MALSBERGER, 1965; OIE und LOH, 1969) als auch in vivo bei lebenden Regenbogenforellen (S. gairdneri) nachgewiesen (DE KINKELIN und DORSON, 1973; DORSON et al., 1975). Lektine kommen auch bei zahlreichen niedrigen Vertebraten inklusive Fischen vor (HOLT und ANSTEE, 1975) und können Schutzeigenschaften gegen eindringende Bakterien und andere Parasiten zeigen. Ähnliche Substanzen wurden in Fischeiern nachgewiesen (ANSTEE et al., 1973), in denen Immunglobuline nicht vorhanden zu sein scheinen.

Die zelluläre unspezifische Abwehr erfolgt durch Phagozytose, die nach GRACE und MANNING (1980) und GRACE et al. (1981) sowie MANNING et al. (1982) bei Regenbogenforellen (S. gairdneri) ab dem 4. Lebenstag festgestellt werden kann. Die Aufnahme von Fremdpartikeln durch die dazu fähigen Zellen kann nach SCHÄPERCLAUS (1979) in Kapillarwandzellen, im

Gewebe (Monozyten), in lymphoiden Geweben des Magen- Darm-Kanals und in Retikulum- und Sinusendothelzellen retikulärer Organe (Milz und Niere) erfolgen.

Die Phagozytose stellt ein besonderes Element der Wirtabwehr gegen eingedrungene Mikroorganismen dar. Bei Entzündungsprozessen durch virale, bakterielle, mykotische bzw. parasitäre Ursachen wandern wie bei Säugetieren Phagozyten (Makrophagen, Neutrophile Granulozyten, Melanomakrophagen, Monozyten) ins Gewebe ein (WOOD et al., 1955; WOOD und ORDAL 1958; KLONTZ, 1965; ROBERTS et al., 1969).

Die Makrophagen kommen im Herz (Atrium), Niere, Milz und Peritoneum, aber nicht im Thymus vor (ELLIS et al., 1976; ELLIS, 1977; MCKINNEY et al., 1977).

Über die Modulation der unspezifischen Abwehrmechanismen in Fischen berichtete neuerdings FLETCHER (1986).

5.2.b. Spezifische Abwehrmechanismen

Die spezifische Abwehr setzt sich aus zellulären und humoralen Mechanismen zusammen (SCHÄPERCLAUS, 1979). Die unspezifischen sowie die spezifischen zellulären Abwehrvorgänge sind nach MANNING et al. (1982) bei Karpfen (Cyprinus carpio) und Regenbogenforellen (S. gairdneri) bereits im Alter von wenigen Wochen entwickelt. Hingegen wird die Fähigkeit Antikörper zu produzieren erst im Laufe des 1. Lebensjahres erreicht. Nach ROBERTS (1978) basiert die spezifische Immunität beim Fisch wie beim Säuger auf adaptiven Veränderungen, die innerhalb der zellulären Populationen des lymphatischen Systems stattfinden. Sie zeichnet sich durch vier Hauptparameter aus: (a) Die Fähigkeit, spezifische Immunglobuline zu produzieren (b) Zellvermittelte Immunität (c) Unmittelbare und verzögerte Hypersensibilität und (d) Die Fähigkeit des immunologischen Gedächtnisses. Durch primäre Antigenstimulation können lymphoide Zellen zur Vermehrung und spezifischen Antikörperbildung, das heißt zur Primärimmunantwort, veranlaßt werden (SECOMBES und MANNING, 1980;

MANNING et al., 1982). Fische sind auch zur Sekundärimmunreaktion durch Gedächtniszellen fähig (HILDEMANN und THOENES, 1969; SCHAPERCLAUS, 1979). Mit Hilfe des Rosetten-Testes stellen CHILLER et al. (1969 a) die Morphologie der antikörperbildenden Zellen im lymphoiden Gewebe der Regenbogenforellen (S. gairdneri) nach Schaferythrozytenverabreichung fest. Phasen- und Elektronenmikroskopie zeigen fünf morphologisch unterschiedliche Zellarten, die zur Rosettenbildung fähig sind, und zwar Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen, blastartige Zellen und eosinophilähnliche Zellen.

Alle diese Zellen werden sowohl in der Milz als auch in der Kopfniere gefunden. Mit Hilfe des passiven hämolytischen Plaque-Testes finden KAATTARI und IRWIN (1985) signifikante plaquebildende Zellen in der Milz, der Kopfniere und im Thymusgewebe von Silberlachsen (Oncorhynchus kisutch), die mit dem O-Antigenextrakt von V. anguillarum immunisiert worden waren. Plaquebildende zelluläre Immunreaktionen erweisen sich als immunoglobulinvermittelt und antigenspezifisch. Profile der reaktiven plaquebildenden Zellpopulationen zeigen, daß die Erkennung des Antigens durch die Zellen der Kopfniere weniger umfangreich erfolgt als durch diejenigen der Milz.

Im Gegensatz zu den fünf Immunglobulinklassen bei Säugetieren wird bei Fischen bisher nur eine Klasse, und zwar die IgM-Klasse, nachgewiesen (LITMANN, 1975; OLLENSCHLÄGER, 1978; ELLIS, 1982), die teils als Monomere (FLETCHER und GRANT, 1969; ELLIS, 1982), teils als Tetra- bzw. Pentamere (SHELTON und SMITH, 1970; LITMANN, 1975; ELLIS, 1982) auftreten. Nach CORBEL (1975) und ELLIS (1982) ist die Gruppe der Lungenfische (Dipnoi) die einzige Fischgruppe mit zwei Immunglobulinklassen. Innerhalb der Globulinklasse der IgM beim Fisch sollen nach DORSON (1972) und ELLIS (1982) mehrere Subklassen existieren. Hinsichtlich ihres Aufbaus ähneln die Immunglobuline bei Fischen denjenigen bei Säugetieren (STANWORTH und TURNER, 1973; CORBEL, 1975; SCHAPERCLAUS, 1979; ELLIS, 1982). Ferner werden den Fisch-Immunglobulinen zytolytische, agglutinierende, passiv hämaggluti-

nierende, hämagglutinationshemmende, neutralisierende und teilweise präzipitierende Eigenschaften zugesprochen (CLEM und MCLEAN, 1975; ROBERTS, 1978; ELLIS, 1982; SCHAUNER, 1986).

Serumantikörper können auch in den Gewebsflüssigkeiten sowie im Schleimsekret der Haut, des Verdauungstraktes und der Kiemen auftreten, was vor allem durch die besondere Gefäßwand der Fische bedingt ist. Letztere ist für die Immunglobuline durchlässig (WARDLE, 1971; MACKIE und WARDLE, 1971; ELLIS, 1982). Jedoch können Immunglobuline auch örtlich im Schleimhautepithel durch Plasmazellen produziert werden (FLETCHER und WHITE, 1973; ROBERTS, 1978).

Obwohl man bisher keine eindeutig definierte T-Zelle im Immunsystem der Fische nachgewiesen hat, spielen jedoch T-Zellähnliche Funktionen bei bestimmten Immunreaktionen des Fisches eine integrierte Rolle (RUBEN et al., 1977; MILLER et al., 1985; IRWIN und KAATTARI, 1986). Die Untersuchungsergebnisse von SECOMBES (1986) zeigen, daß ein Zusammenwirken zwischen den humoralen und zellvermittelten Immunreaktionen und Makrophagen bei Forellen erfolgt.

6. Immunkomplex-Glomerulonephritis

6.1. Immunkomplex-Glomerulonephritis der Mammalia

Da bisher keine Angaben über durch Immunkomplexe (IK) in der Niere des Fisches verursachte Veränderungen mit Ausnahme der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHS) der Regenbogenforellen (ELGER und HENTSCHEL, 1983) und einer chronischen Glomerulonephritis bei Königslachsen (MEYERS und MCPHERSON, 1985) in der zugänglichen Literatur vorliegen, werden im folgenden zunächst die entsprechenden Veränderungen der Mammalia zum Vergleich herangezogen.

Glomerulonephritiden werden bei allen Haustieren beschrieben. Sie sind mit den beim Menschen bekannten Formen vergleichbar (SANDRITTER und THOMAS, 1981). Die Glomerulonephritis (GN) tritt entweder in der Niere bei allen Glomerula diffus verteilt auf oder beschränkt sich fokal auf einzelne Areale. Entweder sind alle Schlingen (panglomerulär) eines Glomerulums in den Entzündungsprozeß einbezogen oder es ist nur ein Teil derselben (segmental) betroffen. Es können alle Entzündungsformen vertreten sein, so z.B. Exsudation (Durchtritt von Blutplasma und Fibrin, Anhäufung von Granulozyten, Nekrosen) oder Proliferation von Zellen des Mesangiums und des Endothels (mesangiale bzw. endokapillär-proliferative GN) oder des parietalen Kapselblattes (intra- extrakapilläre proliferative GN). Bei der sogenannten membranösen GN ist vorwiegend die Basalmembran (BM) verdickt, knotig aufgetrieben oder aufgefasert. Bei einer Kombination von BM-Verdickung und Proliferation spricht man von der membranoproliferativen GN. Bei längerer Dauer kommt es zu Sklerose der Glomerula. Die Mesangiummatrix ist vermehrt und die meisten Glomerula vollständig hyalin verödet. Das interstitielle Bindegewebe ist verbreitert und lymphozytär infiltriert. Neben den Narbenbezirken liegen kompensatorisch hypertrophe Areale mit erhaltenen Glomerula und stark erweiterten Nierentubuli vor. Bei fast allen Formen der GN des Menschen und

der Haustiere werden Immunkomplexe im Mesangium oder an der BM nachgewiesen. Die Nieren gelten als für die Manifestation von Immunreaktionen prädestiniert (DAHME und WEISS, 1978). Antigen-Antikörper-Komplexe werden im Verlauf von Filtrationsprozessen in der BM der Glomerula abgelagert oder die mit vielen organspezifischen Antigenen ausgestattete BM wird zum Ort mehr oder minder nierenspezifischer antikörpervermittelter Immunreaktionen. Die Antikörper bildet der Organismus selbst (Autoimmun-GN). Bei der Immunkomplex-GN werden im Blut vorhandene Komplexe aus nierenfremden Antigenen und Antikörpern in den Kapillarschlingen abgelagert. Der Antigen-Antikörperreaktion folgt eine Komplementaktivierung ($C_1 - C_9$ bes. C_3), womit alle entzündlichen Vorgänge erklärt werden können.

Beim Haustier wurde bis jetzt nur die Immunkomplex-GN ermittelt. Immunfluoreszenzhistologisch lassen sich Immunglobuline (beim Haustier IgG, selten IgA) oder Properdin nachweisen. Sie werden je nach Größe subendothelial und mesangial bzw. im subepithelialen Bereich abgelagert.

SANDRITTER und THOMAS (1981) veröffentlichen folgende tabellarische Übersicht der GN des Menschen. (Tab. 2)

Tabelle 2: Einteilung der Glomerulonephritis nach SANDRITTER
und THOMAS (1981).

<u>Bezeichnung</u>	<u>Morphologie</u> <u>(Leitbild)</u>	<u>Pathogenese</u> <u>+ Immunologie</u>
Exsudative GN (akute exsudative- proliferative GN)	Granulozyten, Exsudation und geringe Mesangium- und Endothelproliferati- on.	Postinfektiöse (Streptokok- keninfekte, Sklerotische Angina) Serum- krankheit IK-GN; Subepi- theliale und mesangiale IK- Depots.
Mesangiale proli- ferative GN („in- trakapilläre" GN) akut - chronisch	Mesangium- und geringe Endothelproliferation	Postinfektiös (Strepto-, Staphylokok- ken-, Virus-In- fekte) IK-GN; Mesangiale und subepitheliale Immundepots in den Schlingen; IgA-Nephritis.
Intra-extrakapil- läre proliferative GN („extrakapil- läre" GN) schnell fort- schreitend	Proliferative partiale Kapsel-Epithelien „Halb- monde"; Geringe Endo- thel und Mesangiumproli- feration; Variante: nekrotisierend.	Anti-BM GN. Bei Goodpasture- Syndrom mit Lungenbeteili- gung. Immunglo- buline diffus linear entlang der BM.

Tabelle 2: Fortsetzung 1

Membranöse GN (peri- oder epi- membranöse GN)	BM stark verdickt; An- fangs sog. Spikes, später doppelkonturiert; Keine oder wenig Zell- proliferation.	IK-GN Subepi- theliale Immun- depots; Spikes; Bei Aleuten- Krankheit der Nerze, nach Pe- nicillamin- und Goldtherapie.
Membrano- proli- ferative GN (mesangio- kapil- läre GN)	BM verdickt (doppelkon- turiert) Mesangiumpro- liferation; Zellen zwischen doppelter BM.	Hypokomplement- ämie persis- tierend; Suben- dotheliale oder intramembranöse Immudepots.
Minimale GN (Minimal Glomeru- litis) Lipoidneph- rose minimal changes	Glomerula lichtmikrosko- pisch unauffällig oder nur minimale Mesangium- proliferation	Minimal GN (Ausheilungs- stadium einer mesangioprolif- erativen GN, häufig IF-posi- tiv); Minimal changes (IF- negativ= keine Immunde- pots.
Fokale und/oder segmentale GN	Einzelne Glomerula betroffen und/oder ein- zelne Schlingengruppen; Proliferierend oder sklerosierend/hyalini- sierend.	Idiopathisch oder postinfek- tiös oder im Rahmen bestimm- ter Grund- krankheiten.

Bei anderen Formen der GN so, z. B. bei Löhlein'scher Herd-
nephritis und embolisch pyämischen Nierenabszessen, werden
keine Immudepots nachgewiesen.

Im Experiment wird bei Tieren eine autoallergische GN durch Injektion eines glomerulären BM-Extraktes in komplettem Freund's Adjuvans produziert, welches die Antikörperproduktion an der glomerulären BM stimuliert (SELL, 1987).

Ein experimenteller passiver Transfer von heterologen Antisera zu Glomerula, z. B. von Kaninchen-Antirattenserum zu Ratten, verursacht eine nephrotoxische Serum-Nephritis (Masugi-Nephritis).

Immunkomplex-GN beim Haustier ist nach DAHME und WEISS (1978) bislang im Zusammenhang mit folgenden Krankheiten beschrieben worden: Pyometra (Hund), systemischer Lupus erythematodes (Hund, membranöse GN, wahrscheinlich virusbedingt), Dirofilariose (Hund), Adenovirus-Infektion (Hund), Leukose (Katze), infektiöse Anämie (Pferd), chronische Schweinepest, Aleuten-Krankheit der Nerze. Daneben gibt es bei allen Haustieren, vor allem bei Hund und Schaf, GN vom Immunkomplex-Typ, deren Ätiologie unbekannt ist und die häufig ohne besondere klinische Symptome verläuft.

6.2. Immunkomplex-Glomerulonephritiden der Fische

Wie eingangs erwähnt sind bislang sehr wenige Mitteilungen über Immunkomplex-Glomerulonephritiden beim Fisch in der zugänglichen Literatur zu finden. Erst 1983 berichteten ELGER und HENTSCHEL über eine glomeruläre Nephritis bei gezüchteten Regenbogenforellen (S. gairdneri), die vermutlich unter chronischer Viraler Hämorrhagischer Septikämie (VHS) litten. Dabei wurden folgende Hauptveränderungen in den Glomerula vieler kranker Fische festgestellt: (a) Ablagerungen im subendothelial-mesangialen Bereich, (b) das Vorhandensein mononukleärer Zellen in den Kapillaren, und in der Wand der glomerulären Schlingen. Ihrer Ansicht nach kann das Vorhandensein von Ablagerungen im subendothelial-mesangialen Bereich unter dem Begriff der Immunkomplex-GN eingereiht werden. Unlösliche Makromoleküle sollen von der Blutbahnseite her in die Kapillarwand eingedrungen sein. Diese Ablagerun-

gen wurden jedoch nicht immunhistochemisch als Immunkomplex identifiziert. Es wurde nur die Anwesenheit von Makromolekülen des IgM-Types in den subendothelialen Ablagerungen vermutet. Die Mononukleäreninfiltrate der Kapillarschlingen, die Makrophagen in den subendothelialen Räumen und die Monozyten in den Kapillarlumina wurden von den Autoren in Übereinstimmung mit Beobachtungen beim Säuger als Ausdruck erhöhter Phagozytoseaktivität angesehen. Ein spezifisch pathogener Effekt infolge der Freisetzung von Enzymen durch mononukleäre Zellen konnte nicht ausgeschlossen werden.

Ebenfalls wurde von MEYERS und MCPHERSON (1985) über eine chronische GN bei rückkehrenden Herbst-Königslachsen (Oncorhynchus tshawytscha) aus dem Rogue-Fluß (Oregon, USA) berichtet. Sie beobachteten bei fünf von sechs Nieren von adulten moribunden Lachsen eine diffuse chronische glomeruläre Nephritis, die durch Hypertrophie verschiedener glomerulärer Zelltypen, Adhäsionen an der Bowman'schen Kapsel, oft mit vollkommenem Verschuß des Bowman'schen Raumes und durch eine ausgeprägte Hypertrophie der glomerulären Schlingen gekennzeichnet war. Gelegentlich wurden auch Nekrosen innerhalb der Glomerula, verdickte und desorganisierte BM, periglomeruläre Fibrose und ein Verschuß der glomerulären Kapillarlumina gesehen. Ferner wurden hyaline und zelluläre Niederschläge in den proximalen Tubuli wie auch tubuläre Nekrosen festgestellt. Die Ursache dieser GN in den Herbst-Königslachsen (O. tshawytscha) wurde nicht ermittelt. Die Beteiligung von Immunkomplexen am Krankheitsgeschehen wurde nur aufgrund der festgestellten histopathologischen Veränderungen angenommen, da sie auffallend denjenigen der chronischen GN bei Mammalia ähnelten.

6.3. Pathogenese der Immunkomplex-Glomerulonephritis

Nach SELL (1978) werden Immunkomplexe entweder ortsfern gebildet und dann in den Glomeruli abgelagert oder sie entstehen durch eine direkte Reaktion der Antikörper mit der glomerulären BM. Um die Pathogenese der antikörpervermittelten GN zu verstehen, muß man sich der normalen Struktur des Glomerulums erinnern. Das Glomerulum ist der Teil des Nephrons, der für die Ultrafiltration des Blutes verantwortlich ist. Anschließend sammelt der Tubulus das Filtrat und resorbiert die Elektrolyte zurück. Das Glomerulum besteht aus vier Hauptzelltypen, die jeweils eine spezifische Funktion besitzen: Endothelzellen, die das glomeruläre Kapillarnetzwerk auskleiden; Mesangiumzellen im Aufhängesystem der Kapillaren; zwei Typen von Epithelzellen, viszerale und parietale. Das Mesangium besteht aus Zellen des Retikuloendothelialen Systems und kann Immunkomplexe aufnehmen. Die viszerale Epithelzellen bekleiden die äußere Fläche der kapillaren BM, und die parietalen Epithelzellen umhüllen die innere Fläche der äußeren Kapsel des Glomerulums.

Die kritische Eigenschaft des Glomerulums besteht darin, daß die kapillare BM nicht vollständig mit den Endothelzellen ausgekleidet ist. Dies ermöglicht entweder den Anti-BM-Antikörpern oder den Immunkomplexen den Durchtritt durch die BM. Eine Komplementaktivierung (Anaphylatoxin) oder Mastzellen-Mediatoren können ein weiteres Auseinandergleiten der Endothelzellen durch Kontraktion verursachen. Veränderungen der BM können durch zwei Mechanismen entstehen: (a) Direkt durch Ablagerungen von Komplexen oder Antikörpern, welche die elektrostatischen Eigenschaften der BM ändern und ein anschließendes Durchsickern der Serumproteine ermöglichen oder (b) indirekt durch eine komplementvermittelte Attraktion der polymorphkernigen (PMN) Leukozyten, die anschließend Enzyme freisetzen und damit die BM verdauen. Die Läsionen können sich entweder auflösen oder sich zur chronischen Entzündung mit Infiltration von mononukleären Zellen

entwickeln. Mononukleäre Zellinfiltrate finden sich bei der chronischen progressiven GN. Außerdem kann die chronische Ablagerung von Immunkomplexen eine Verdickung der BM und eine Fusion der fußähnlichen Zellausläufer der Epithelzellen induzieren. Die Auflösung der BM steht im Zusammenhang mit dem Auftreten von Blutkomponenten im Urin (Proteinurie, Hämaturie, nephrotisches Syndrom), während die Verdickung der BM einen Verlust der Filtrationskapazität und eine Urämie (urämisches Syndrom) verursacht (SELL, 1978).

Die elektrische Ladung der Immunkomplexe in der glomerulären BM kann das Ausmaß und die Lokalisation der Läsionen beeinflussen. Die BM ist stark negativ geladen. In experimentellen Krankheitsmodellen tendieren hochgradig kationische Antigene in Form löslicher Antigene bzw. löslicher Immunkomplexe dazu, sich entweder in der BM abzulagern oder durch sie zu passieren. Andererseits kann die Lokalisation anionischer Antigene in der BM verhindert werden, oder sie werden an der endothelialen Seite abgelagert. Die 'Neutralisation' einer kationischen BM durch anionische Ablagerungen kann zu erhöhter Permeabilität für die kleineren Serumproteine wie das Serumalbumin führen. Auf diese Weise kann Proteinurie ohne neutrophilen-vermittelte BM-Zerstörung entstehen (SELL, 1978). Nach DAHME und WEISS (1978) soll der Ort der Ablagerung der Immunkomplexe von deren Größen abhängen: Große werden subendothelial abgefangen und von Mesangiumzellen phagozytiert (mesangial), während kleinere in die glomeruläre BM (membranös) und durch diese hindurch in den subepithelialen Bereich gelangen können.

6.3.a. Die Rolle zirkulierender Immunkomplexe bei der Pathogenese der Immunkomplex-Glomerulonephritis

WILSON und DIXON (1971) konnten im Serum von Kaninchen mit Serumkrankheit mittels radiomarkiertem Rinderserumalbumin und fluoreszierenden Antikörpern zirkulierende Immunkomplexe nachweisen und gleichzeitig in den glomerulären Veränderungen

gen dieser Tiere Rinderserumalbumin, Immunglobulin und Komplement feststellen. Die Ablagerung von zirkulierenden Immunkomplexen ist vor allem für den zweiten ursächlichen Mechanismus der Immunkomplex-GN-Entstehung verantwortlich, bei welchem die Antikörper ortsfern gegen einen nichtglomeruläres endogenes (DNA, Tumorantigen) oder exogenes Antigen (Virus, Bakterium, Mycoplasmen, Futterantigene) gebildet werden. Durch Zusatz von Komplement, Antiglobulinen, Konglutininen und Faktoren aus dem Gerinnungssystem (MANNIK et al., 1983) können die Ablagerungen größer werden. Durch die Immunfluoreszenz wird in diesen Fällen eine granuläre Ablagerung von Immunkomplexen ermittelt, während bei Antikörpern gegen die Basalmembran die Ablagerung subepithelial erfolgt. Mesangiale Ablagerungen entstehen sowohl durch zirkulierende Immunkomplexe als auch bei deren lokaler Bildung. Die Bildung zirkulierender Immunkomplexe (zIK) gilt als normaler Vorgang bei der Verteidigung eines Organismus gegen Fremdanigene. ZIK werden aus der Zirkulation durch Fc- und Komplementrezeptoren des mononukleären Phagensystems entfernt und in der Leber abgebaut. Da die zirkulierenden Antikörper sehr heterogen zusammengesetzt sind, geben die verschiedenen bisher bekannten Methoden zum Nachweis der zIK stark voneinander abweichende Ergebnisse (SØLLING, 1985). Es gibt keine Methode mit der alle Arten von zIK nachgewiesen werden können. ZIK können vorkommen, ohne daß eine GN vorliegt, und Immunkomplex-GN wurde festgestellt, ohne daß zIK ermittelt werden konnten. Es gibt nur wenige Formen der Immunkomplex-GN bei denen verhältnismäßig regelmäßig zIK entdeckt wurden. Durch die Immunfluoreszenz und die Elektronenmikroskopie kann die Immunkomplex-GN wesentlich sicherer diagnostiziert werden (SØLLING, 1985).

6.4. Histopathologie der Immunkomplex-Glomerulonephritis

Nach WILSON und DIXON (1979) sind die meisten Glomerulonephritiden durch Zellproliferationen charakterisiert; d.h., daß

eine Kombination von einer erhöhten Anzahl Endothel-, Epithel- und/oder Mesangiumzellen vorhanden ist. Zusätzlich finden sich Ansammlungen von polymorphkernigen Leukozyten und Lymphozyten, Abweichungen der glomerulären Architektur, Halbmonde, Verdickung der glomerulären BM und eventuell Sklerose. LAMBERT und DIXON (1968) beschreiben bei GN der NZB/W Mäuse eine generalisierte Verdickung der Kapillarwände und typische drahtschlingenartige Läsionen; PAS-positive Ablagerungen sind sowohl entlang der Kapillarwände als auch im Mesangium zu beobachten. STRATTA et al. (1988) sehen bei einer durch ein Herpizid (Paraquat) verursachten immunvermittelten GN eine diffuse aber unregelmäßig verteilte mittelgradige mesangiale und endokapillare Proliferation der Glomerula. Bei 1/3 der Glomerula ist der Bowman'sche Raum teilweise durch kleine epitheliale oder fibro-epitheliale halbmondförmige Strukturen verschlossen. Eindeutige segmentäre Sklerosen sind in einigen Glomerula zu beobachten; das Interstitium ist nur gelegentlich durch leichtes Ödem, Fibrose und durch geringgradige Infiltration von chronischen Entzündungszellen verbreitert. Dort werden keine tubulären bzw. vaskulären Veränderungen festgestellt.

6.5. Elektronenmikroskopie

Nach WILSON und DIXON (1979) können die Immunkomplex-Ablagerungen elektronenmikroskopisch durch ihre typischen elektronendichten Erscheinungen identifiziert werden. Bei der akuten exsudativ-proliferativen GN des Menschen (SANDRITTER und THOMAS, 1981) finden sich elektronendichte Immunkomplex-Ablagerungen im Mesangium und auf der Außenseite der zarten BM. Im Kapillarlumen und im Mesangium treten vermehrt neutrophile Granulozyten auf. LAMBERT und DIXON (1968) berichten bei GN der NZB/W Mäuse über unregelmäßige, subendotheliale, elektronentrübe Ablagerungen entlang der glomerulären BM, die mit den IF Befunden identisch sind. Ferner beobachten sie eine Ansammlung von Plasmaproteinen im höchst reak-

tiven Mesangium sowie einen intrakapillären Fibrinniederschlag, der wahrscheinlich durch eine diffuse intravaskuläre Koagulation hervorgerufen worden ist. STRATTA et al. (1988) stellten bei einer Herpizid (Paraquat) verursachten immunvermittelten GN eine fleckige Fusion der fußähnlichen Zellausläufer, eine fokale dünne BM und verdünnte Zonen sowohl an der endothelialen als auch an der epithelialen Seite fest. Die BM einer Kapillarschlinge ist beinahe vollständig fragmentiert; die Epithel- und Endothelzellen liegen dicht beieinander. Elektronendichte Ablagerungen werden nicht gefunden. Jedoch sind einige Kapillarlumina mit hypertrophierten Endothelzellen gefüllt; eine fokale mittelmäßige Hyperplasie der Mesangiumzellen liegt ebenfalls vor.

III. Eigene Untersuchungen

1. Material

1.1 Versuchstiere

Als Untersuchungsmaterial dienten sechs institutseigene Regenbogenforellen (S. gairdneri), die aus einer im Jahre 1985 experimentell mit R. salmoninarum Stamm ATCC 33209 (KETTLER, 1987) infizierten Gruppe stammten. Die durchschnittliche Größe der Fische betrug 43 bis 48 cm bei einem Gewicht von 720 bis 1200 g. Diese Regenbogenforellen wurden seither in einem gut durchlüfteten Aquarium (200 l) gehalten. Der Wasserdurchlauf lag bei 1 - 1,5 l pro Minute. Das Wasser mit einer Temperatur von 11 - 14° C durchlief vorher eine Entchlorungsanlage und besaß einen Härtegrad von 16,4° dH. Die Fütterung der Fische erfolgte einmal täglich mit kommerziellem pelletiertem Regenbogenforellen-Alleinfutter. Ferner dienten zwei nicht infizierte Regenbogenforellen gleicher Größe als Kontrolle.

2. Methoden

2.1. Sektion

Unmittelbar nach Tötung der Versuchsfische (mit einer Überdosis von Tricaine-Methane-Sulphonate, MS 222[®] der Firma Sandoz) wurden aus der Kaudalvene jeweils ca. 3 ml Blut in Eppendorfhütchen entnommen und über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen. Zur Serumgewinnung wurden die Blutproben dann bei 4000 rpm für 5 Min. zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung in der Tiefkühltruhe bei -20° C aufbewahrt.

Die Fische wurden gewogen, gemessen und anschließend se-

ziert.

Äußere Befunde an der Haut und den Augen sowie innere Veränderungen der Organe, insbesondere der Niere, wurden notiert. Teile der Kopf- und Rumpfniere wurden von jedem Fisch steril entnommen und in 5% -igem gepuffertem Formalin fixiert.

2.2. Histologische Untersuchungen

2.2.a. Lichtmikroskopie

Die entnommenen Organproben wurden in 5%-igem gepuffertem Formalin fixiert. Ferner wurde die Fixierung nach Zenker angewendet. Anschließend wurde in Paraplast[®] eingebettet. Die Präparate wurden mittels eines Schlitten-Mikrotoms (Fa. R. Jung AG) in einer Dicke von 5 µm geschnitten, mit Hämatoxylin-Eosin (HE), Silberimprägnierung nach Gomori (ROMEIS, 1968) und mit der Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) gefärbt. Ausgewertet wurden die Schnitte dann mit Hilfe des SM-Lux Mikroskopes (Leitz). Photographien konnten mit einem Photomikroskop G 41-170 (Zeiss) angefertigt werden.

2.3. Elektronenmikroskopie

Teile aus dem mittleren und kaudalen Bereich der Rumpfniere wurden mit Rasierklingen in ca. 1x1x1 mm große Stücke geschnitten und sofort in bereits vorher hergestellter 1 %-iger kalter Glutaraldehydelösung in PBS (pH 7,0 - 7,2) fixiert. Nach 6 Min. wurde die Lösung abgekippt und zu den Präparaten 1 %-ige Osmiumtetroxidlösung in PBS für 20 - 30 Min. hinzugefügt. Nach Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe wurden die Gewebeproben nach dem Abkippen des Alkohols in 100 %-iges Propylenoxid für 15 Min. gegeben. Anschließend verblieben sie in einer Epon-100 %-igen Propylenoxid-Mischung im Verhältnis 50 : 50 mindestens 2 Stunden in geschlossenen Behältern. Dann wurde die gesamte Menge bis

auf ca. 1/16 abgekippt und die Behälter eine weitere Stunde offen stehen gelassen. Daraufhin wurden die Gewebeproben in vorgetrocknete Gelatine kapseln eingebracht und mit Epon nach LUFT (1961) eingebettet. Nach mindestens 2 - 3 Tagen Polymerisation im Brutschrank (60° C) wurden die Gelatinehüllen in warmem Wasser entfernt, die Blöckchen nochmals getrocknet und schließlich mit der Trimmvorrichtung TM 60 der Firma Reichert Jung für die Herstellung von Semidünnschnitten vorbereitet.

2.3.a. Semidünnschnitte

Geschnitten wurden die getrimmten Blöckchen mit einem Porter Blum MT-1-Ultramikrotom (Sorvell). Die 0,5 - 1 µm dicken Semidünnschnitte wurden auf Objektträger aufgebracht, getrocknet und anschließend mit Toluidinblau- und Safraninlösung gefärbt.

2.3.b. Ultradünnschnitte

Ultradünnschnitte wurden mit einem Ultracut (Reichert-Jung) angefertigt und mit 2 %-iger Uranylazetatlösung nach Reynolds für 20-30 Min. und mit Bleizitratlösung für 10-15 Min. kontrastiert. Die Beurteilung der Schnitte erfolgte mit einem Elektronenmikroskop EM 109 der Firma Zeiss.

2.4. Immunkomplex-Nachweis im Gewebe

2.4.a. Indirekte Immunfluoreszenz-Technik an Kryostat-schnitten

Folgende Seren wurden von der Firma Seromed Biochrom KG, Berlin, bezogen: 1. Anti-Regenbogenforellen-Ig vom Schaf

2. Normales Schafserum

Das FITC markierte anti-Schaf-Ig der Firma Cappel wurde vom Institut für Parasitologie und Tropenmedizin der Universität München zur Verfügung gestellt.

Es wurden mit Eiweißglyzerinpuffer vorbehandelte Objektträger verwendet.

Zur Erprobung der Methode wurden die Milzschnitte von Regenbogenforellen (Salmo gairdneri) mit einem Anti-Forellen-Ig Serum in verschiedenen Verdünnungen (1:20, 1:40, 1:80, 1:160) ausgetestet. Als positiver Parameter diente dabei die Oberflächen-Ig-Markierung von Lymphozyten in der Milz. Die Verdünnung 1:80 mit PBS (pH 7,5) hat sich am besten bewährt.

Nierenkryostatschnitte infizierter Forellen (ca. 5-7 μ m Schnittdicke) wurden mit dem Anti-Forellen-Ig Serum in Verdünnung 1:80 bedeckt und anschließend bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer für 30 Min. inkubiert. Nach 3x5 Min. Waschen mit PBS (pH 7,5) erfolgte eine Behandlung mit Anti-Schaf-Ig FITC-Konjugat in einer Verdünnung von 1:50 und eine Gegenfärbung mit 1 %-igem Evans-Blue. Danach wurden die Schnitte wie oben inkubiert, gewaschen und schließlich mit Glyzerinpuffer (pH 8,5) eingedeckt. Die Präparate wurden entweder bei -20° C aufbewahrt oder direkt mit Hilfe eines Leitz-Dialux 20-Mikroskopes mit Fluoreszenzeinrichtung, einem Sperrfilter (K 510) und Ölimmersion-Objektiv (x 63) betrachtet.

Als Positivkontrolle wurde auf jeden Objektträger auch der Kryostatschnitt der Milz eines Kontrollfisches gebracht und zusammen mit der infizierten Niere gleichsinnig behandelt.

Als Negativkontrolle wurde Schaf-Normalserum 1:50 auf Parallelschnitten in Schritt 1 verwendet.

2.4.b. Indirekte Immunfluoreszenz-Technik an Paraffinschnitten

Paraffinschnitte wurden in Clearent (Firma Technicon) und in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert. Die Schnitte wurden in kaltem (-10° C) Azeton für ca. 15 Min. behandelt, luftgetrocknet und anschließend entsprechend wie in 2.4.a. weiterbehandelt.

2.5. Nachweis von R. salmoninarum

2.5.a. Erregeranzüchtung

Für die Anzucht des R. salmoninarum wurde mittels einer sterilen Pinzette ein erbsengroßes Nierenstück von jedem Fisch in ein Eppendorfhütchen gegeben, 1 ml steriles kaltes Peptonwasser hinzugefügt und mit Hilfe eines Ultraschallhomogenators "Vortex" für ca. 1 Min. homogenisiert. Die Suspension wurde dann bei 6000 rpm für 5 Min. zentrifugiert, der Überstand abgekippt, 1 ml steriles PBS (pH 7,5) dem Sediment zugefügt und anschließend nochmals für 1 Min. homogenisiert. Die so gewonnene Suspension diente als Ausgangsmaterial für die Anzüchtung. Es wurden jeweils 0,1 ml der Ausgangssuspension und eine 1:10 mit sterilem PBS weiterverdünnte Suspension auf einem SKDM-Agar (AUSTIN et al., 1983) pipettiert und bei 17° C inkubiert.

Nach drei Wochen wurden die angezüchteten Bakterienkolonien durch Gramfärbung, Beweglichkeitstest, Oxidase-Reaktion (KOVACS, 1956) sowie biochemisch identifiziert.

2.5.b. Indirekte Immunfluoreszenz Technik IFT am Organabklatsch

Folgende Seren wurden verwendet:

1. Kaninchen-Normalserum
2. Kaninchen Anti-KD-Serum
3. FITC-Konjugiertes-a-Kaninchenserum von Ziege (Firma Cappel)

Aus dem kaudalen, mittleren und kranialen Nierenbereich infizierter Forellen und von Kontrollfischen wurde jeweils ein Abklatschpräparat für die indirekte Immunfluoreszenz vorbereitet. Ebenfalls wurden Abklatschpräparate veränderter Augen untersucht. Mit einer sterilen Pinzette wurde die Probe entnommen und auf Objektträger getupft, luftgetrocknet und in kaltem (-10°C) Azeton 15 Min. behandelt. Auf zwei Felder des Objektträgers wurde das Kaninchen-Anti-KD Serum in einer Arbeitsverdünnung von 1:80 und auf das dritte Kontrollfeld, das Kaninchen-Normalserum ebenfalls in einer Verdünnung 1:80 gegeben. Die Präparate wurden daraufhin 30 Min. bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und danach 3x5 Min. mit PBS (pH 7,5) zur Entfernung des nicht gebundenen Serums gewaschen. Anschließend wurden alle 3 Testfelder der Präparate mit FITC-konjugiertem Antikaninchenserum in einer Arbeitsverdünnung von 1:200 bedeckt, wiederum auf dieselbe Weise inkubiert und 3x5 Min. mit PBS (pH 7,5) gewaschen. Schließlich wurden die Präparate vorsichtig abgetupft und mit einem Tropfen Glycerinpuffer (pH 8,5) eingedeckt. Die Präparate wurden entweder bei -20°C aufbewahrt oder sofort mittels eines Mikroskopes Dialux 20 (Leitz) mit einer Fluoreszenzeinrichtung, einem Sperrfilter (K 510) und dem Ölimmersions-Objektiv ($\times 63$) ausgewertet.

2.6. Hämagglutinationshemmungsreaktion (HAH)

Für die HAH-Reaktion wurden Schafererythrozyten (Oxoid FSR 1053) in Form einer 1%-igen Suspension in PBS (pH 7,5) verwendet, ebenso ein R. salmoninarum Antigen, das nach SCHAUNER (1986) hergestellt worden war. Es wurde eine Arbeitsverdünnung des Antigens von 4 HA Einheiten benutzt.

Die zu prüfenden Seren wurden bei 45° C für 30 Min. inaktiviert und in 2-facher Verdünnungsreihe (1:2 bis 1:1028) mit PBS (pH 7,5) in Mikrotiterplatten verdünnt. Dazu wurden konstante Mengen (0,025 ml) der R. salmoninarum-Antigensuspension, die 4 HA Einheiten enthielten, zugegeben. Nach vorsichtigem Schütteln der Platte und Inkubation bei 8° C für 10 Min. wurden konstante Mengen (0,025 ml) einer 1%-igen Schafererythrozytensuspension der Verdünnungsreihe zugefügt, die Platte vorsichtig geschüttelt und bei 20° C für 1-3 Std. inkubiert. Entsprechende Serum-, Antigen- und Erythrozytenkontrollen liefen parallel.

Die Ergebnisse wurden mit bloßem Auge vor hellem Hintergrund nach vollständiger Sedimentation der Erythrozyten in der Kontrolle abgelesen. Als HAH-Titer wurde der letzte Verdünnungsschritt mit vollständiger Hämagglutinationshemmung angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Symptome und Autopsiebefunde

Bei fünf von sechs mit Renibacterium salmoninarum infizierten Forellen wurde eine ein- bzw. beidseitige Linsentrübung sowie ein beidseitiger Exophthalmus festgestellt. Andere klinische Symptome waren nicht vorhanden.

Nach der Tötung zeigten fünf von sechs Fischen eine umfangreiche diffuse Schwellung der rotbraunen elastisch-weichen Kopf- und Rumpfnieren.

Bei einem Tier wurde eine ausgeprägte Schwellung der Blasen, auffallend weichen Milz beobachtet. Ihre Ränder waren abgerundet, die Schnittfläche weich.

Weitere makroskopisch erkennbare Veränderungen lagen nicht vor.

Bei den Kontrollfischen konnten keinerlei abweichende Befunde erhoben werden.

3.2. Pathohistologie

3.2.a. Lichtmikroskopie

Auffallend ist das überaus variable Bild der histologischen Veränderungen. Dies betrifft sowohl die Glomerula als auch die Tubuli. Einzelne Glomerula weisen nur wenige histologische Veränderungen auf, wobei es sich vor allem um Mesangium- und Membranveränderungen des Gefäßknäuels handelt.

Das parietale Blatt der Bowman'schen Kapsel zeigt eine gut ausgeprägte, aber durchwegs dünne unveränderte Basalmembran und flaches Epithel (Abb. 1). Nur einzelne Epithelzellen nehmen eine mehr kubische Form an. Die Weite zwischen parietalem und viszeralem Blatte gelegenen Kapselraumes wechselt bei den Glomerula des gleichen Fisches stark. In diesem Raum befindet sich meist ein zart gekörntes eosinophiles Material

und einige abgeschilferte, degenerierte Zellen. Die Gefäße des glomerulären Hilus und der juxtaglomeruläre Komplex sind zellreich und die Gefäße beinhalten im Lumen wenig eosinophiles Material. Selten wirkt der Kapselraum infolge einer Glomerulumschrumpfung besonders stark erweitert. Bei wenigen Glomerula ist die Basalmembran der Bowman'schen Kapsel deutlich durch Einlagerung von PAS-positivem Material verbreitert und liegt dem viszeralen Blatt dicht an. Eine periglomeruläre Bindegewebszubildung, die sich in mehreren Schichten aufbaut, wird häufig angetroffen.

Das viszerale Blatt der Kapsel besteht aus einer zarten Basalmembran, auf der kubische Epithelzellen (Podozyten) lückenhaft angeordnet sind (Abb. 2). Die Basalmembran der Glomerulumkapillaren ist deutlich ausgeprägt, an manchen Stellen des gleichen Glomerulums zart und dünn, an anderen klobig verdickt und streckenweise doppelt konturiert. Zuweilen besteht nur eine sehr verschwommene Abgrenzung zwischen Membran und Mesangium. Bei PAS-Färbung fällt die Basalmembran der Kapillaren leuchtend rot besonders auf Endothelzellen kleiden die Kapillaren aus. Sie sind im allgemeinen kleiner und besitzen einen dunkleren Kern als die Epithelzellen (Podozyten). Ihr Zytoplasma ist meist um den Kern deutlich sichtbar. In den Kapillaren befinden sich Erythrozyten, Makrophagen und selten einzelne polymorphkernige Leukozyten. Im Zytoplasma der Endothelien und frei im Kapillarlumen sind amorphe teils homogene, teils granuliert PAS-positive Substanzen.

Ohne Verbindung mit dem Kapillarlumen sind die Mesangiumzellen. Sie besitzen in der Regel einen großen und dunklen chromatinreichen Kern und reichlich faseriges Zytoplasma. Die Mesangiumzellen erscheinen vermehrt, die Kerne sind zum Teil pyknotisch oder lösen sich auf, sodaß kleine nekrotische Bezirke entstehen (Abb. 3). Das Zytoplasma der Mesangiumzellen ist zwischen den Kapillaren manchmal verbreitert und färbt sich stark eosinophil und PAS-positiv (Abb. 4).

Bei stärker in Mitleidenschaft gezogenen Glomerula fällt vor allem eine deutliche Beteiligung der Bowman'schen Kapsel

auf. Das parietale Epithel ist auffallend flach, die Kapselbasalmembran ist mehr oder weniger verdickt und außen um die Kapselmembran ist Bindegewebe in bis zu drei Schichten konzentrisch angeordnet (Abb. 5). Der Bowman'sche Raum wird von dem Gefäßknäuel nahezu ganz ausgefüllt, wobei es an einer oder mehreren Stellen zu Adhäsionen zwischen viszeralem und parietalem Kapselblatt kommt. Die ursprüngliche Struktur des Glomerulums ist vielfach kaum noch zu erkennen (Abb. 6). Einige Kapillarlumina sind meist am Rand noch erhalten. Der Rest ist in eine homogene PAS-positive, fibrinoide Masse umgewandelt, an der außen teilweise noch Zellen des viszeralen Blattes vorhanden sind. Die übrigen Zellkerne sind nur noch schemenhaft erkennbar. Eine exakte Zuordnung der Zellen ist innerhalb der homogenen Masse kaum feststellbar. Der zweite Vorgang betrifft die Loslösung des Glomerulums von der Kapsel durch Atrophie oder Schrumpfung des Gefäßknäuels. Der Kapselraum ist in solchen Fällen unverhältnismäßig groß und teilweise mit granuliertem eosinophilem Material, abgeschilferten Zellen oder einigen Erythrozyten gefüllt. Bei wenigen Glomerula kann man im Kapselraum Reste von kollagenen Fasern erkennen, die anscheinend das Gefäßknäuel mit der Kapselwand verbunden hatten. Der Gefäßknäuel ist meist klein und geschrumpft, aber der Aufbau aus viszeralem Epithel, Kapillarschlingen und Mesangium ist noch kenntlich. Die Kapillarschlingen können Blut enthalten. Ihre Basalmembran ist verdickt. Eine Vermehrung von Endothelzellen läßt sich gelegentlich nachweisen. In anderen Glomerula ist aber die fibrinoide Verquellung soweit fortgeschritten, daß Details nicht zu erkennen sind (Abb. 7). Mitunter haben aber die Glomerula infolge der vorausgegangenen Vorgänge solche bizarren Formen angenommen, daß sie als solche kaum noch in Erscheinung treten.

Hämatopoetisches Gewebe umgibt die Glomerula und liegt zwischen den Tubuli. Es enthält reichlich Melanomakrophagen mit randständigen Kernen (Abb. 8). Diffus im Gewebe verteilt scheinen einige wenige Zellen einer Koagulationsnekrose anheimzufallen.

Teilweise verschwinden hierbei Zellgrenzen, und die Kerne lösen sich auf. Auch Kernpyknose ist anzutreffen. Die Tubuli werden an vielen Stellen von einem außerordentlich zellreichen Interstitium umgeben. Innerhalb desselben befinden sich zahlreiche Arteriolen mit einer hyperplastischen Media und einer gleichmäßigen Ablagerung von eosinophilem homogenem Material in der Intima, was eine Verengung und einen Verschuß des Gefäßlumens zu Folge hat (Abb. 7). Die Tubuli zeigen teilweise, besonders in der Umgebung der Glomerula, eine zystenartige Erweiterung des Lumens. Die Tubulusepithelien sind gequollen, teilweise vakuolig degeneriert oder zeigen hyalintropfige Eiweißspeicherung und können ebenso wie das Lumen eosinophile, PAS-positive Substanzen enthalten (Abb. 8). Sie lösen sich in größerem Umfang von der Basalmembran ab, liegen frei im Lumen oder lösen sich zu einem schlierigen Inhalt auf. Die basalständigen Zellkerne sind pyknotisch oder verschwunden. Die Sammelkanälchen werden von einer dicken Bindegewebsschicht umgeben. Ihre Epithelauskleidung hat sich meist ganz von der Unterlage gelöst. Andere Tubuli zeigen eine deutliche Verdickung ihrer Basalmembran, die besonders in der PAS-Färbung in Erscheinung tritt. Oft enthalten Tubuli homogene, kernlose eosinophile Massen bzw. hyaline Zylinder. Das Lumen der Tubuli ist häufig von einer PAS-positiven, homogenen Schicht ausgekleidet.

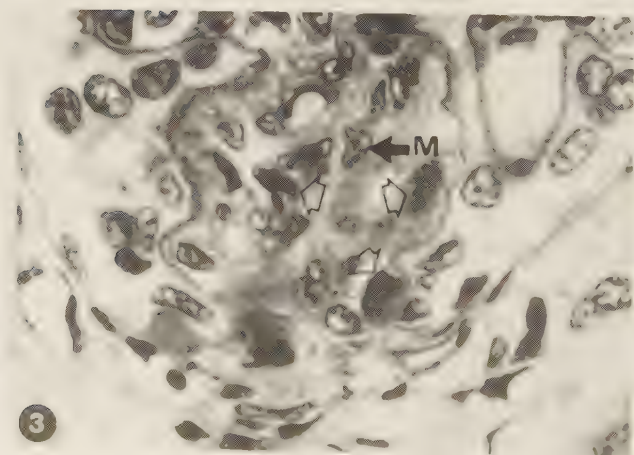
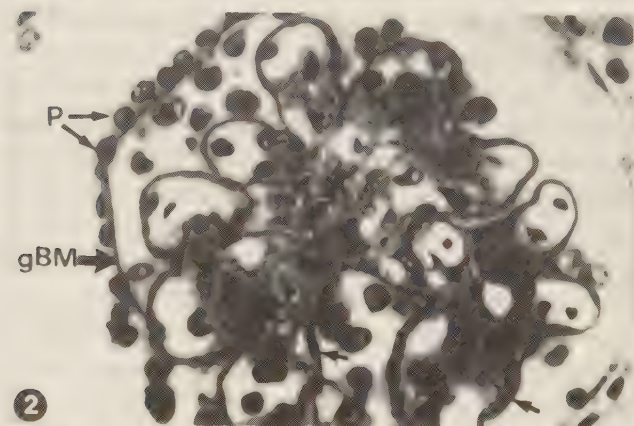
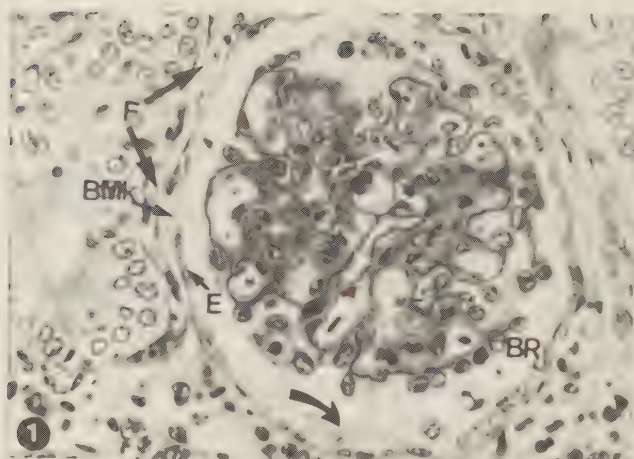


Abb. 1: Wenig verändertes Glomerulum:

Dünne Basalmembran des parietalen Blattes der Bowman'schen Kapsel (➡), von abgeflachten Epithelzellen ausgekleidet (➡) und von einigen Fibrozyten (➡) umgeben. Im Bowman'schen Raum wenig gekörntes eosinophiles Material (➡) und Epithelzellkerne.

Basalmembran der Bowman'schen Kapsel = BKK;

Epithelzellen = E; Fibrozyten = F;

Bowman'sche Raum = BR;

Semidünnschnitt; Toluidinblau-Safraninrot;

Vergr.: 600 x

Abb. 2: Glomerulum:

Viszerales Blatt der Bowman'schen Kapsel mit kubischem Epithel (Podozyten) (➡) auf dünner glomerulärer Basalmembran. Deutliche Basalmembran der Glomerulumkapillaren, teilweise verdickt (➡).

Wenig Mesangium (➡).

Podozyt = P; glomeruläre Basalmembran = gBM;

Mesangium = M;

Semidünnschnitt; Toluidinblau-Safraninrot;

Vergr.: 1000 x

Abb. 3: Glomerulum:

Verhältnismäßig schmales Mesangium mit Nekrose, pyknotischen und lytischen Zellkernen (➡).

Mesangium = M;

Semidünnschnitt; Toluidinblau-Safraninrot;

Vergr.: 1500 x

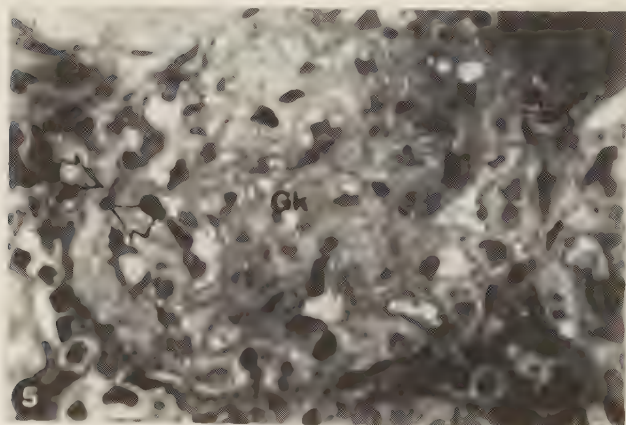
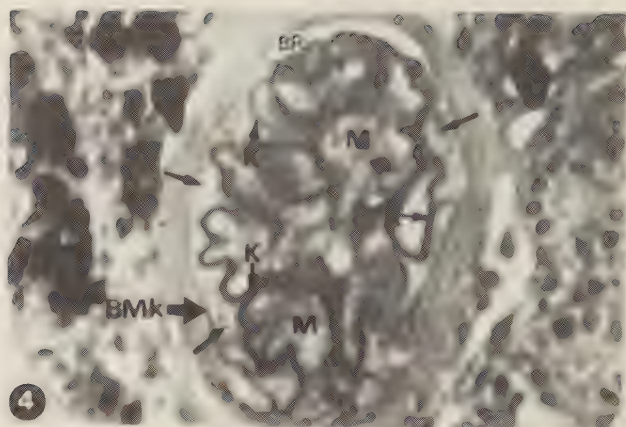


Abb. 4: Leuchtend rote, intensive PAS-positive Reaktion der glomerulären Basalmembran und der Basalmembran des parietalen Bowman'schen Kapselblattes:
Homogene bis wolkig PAS-positive Substanzen im Bowman'schen parietalen Kapselblatt (➡),
im Bowman'schen Raum (➡), in den Kapillaren (➡) und im Mesangium.
Basalmembran der Bowman'schen Kapsel = BMk;
Bowman'sche Raum = BR; Kapillaren = K;
Mesangium = M;
PAS; Vergr.: 1000 x

Abb. 5: Glomerulum:
Adhäsion zwischen parietalem und viszeralem Blatt der Bowman'schen Kapsel (➡). Bizarre Formen und Nekrosen des Gefäßknäuels.
Bowman'sche Kapsel = BK; Gefäßknäuel = Gk;
Semidünnschnitt; Toluidinblau-Safraninrot;
Vergr.: 1000 x

Abb. 6: Fibrinoide Verquellung von Glomerula.
Glomerulum = G;
PAS; Vergr.: 400 x

3.2.b. Elektronenmikroskopie

Die Glomerula werden vielfach vom Interstitium durch eine dicht angrenzende zirkuläre Schicht von Bindegewebszellen getrennt. Die Bowman'sche Kapsel selbst ist meist unverändert. Der unterschiedlich weite Kapselraum enthält entweder ausschließlich am Rande faseriges oder körniges Material oder ist stärker damit angefüllt. Bei einem Großteil der Glomerula liegt die Bowman'sche Kapsel nahe am Gefäßknäuel mit teilweise Kontakt zwischen viszeralem und parietalem Blatt.

Extrazellulär liegende Bakterien wie sie von KETTLER (1987) beschrieben wurden, konnten in den vorliegenden Schnitten nicht festgestellt werden. Es lagen nur vereinzelt Makrophagen im intertubulären hämatopoetischen Gewebe vor, die lokaler verteilte Bakterien enthielten. Diese Phagozyten entsprechen in etwa dem Typ 1 der von KETTLER (1987) beschriebenen phagozytierenden Zellen, doch enthalten sie weniger Bakterien.

Zum Aufbau des normalen Glomerulums gehören drei Zelltypen: (a) Die viszerale Epithelzellen, welche die gesamte Harnoberfläche des Glomerulums bekleiden und für den Filtrierungsprozeß verantwortlich sind. Sie bilden eine physikalische Barriere und synthetisieren außerdem Komponenten der Basallamina, die deren selektiven Charakter bestimmen. Ihr Zytoplasma bildet breite Fortsätze, von denen feine, dünne Ausläufer ausgehen. Eine Schicht aus sauren Mukosubstanzen bedeckt die Oberfläche der Epithelzellen. (b) Im zentralen Teil der glomerulären Gefäßschlingen liegen die Mesangiumzellen, die durch Endothelzellen vom Gefäßlumen und durch die Epithelzellen vom Harnraum getrennt sind. Die Mesangiumzellen haben Ähnlichkeit mit der glatten Muskulatur der Gefäße. Veränderungen in der Zahl der Mesangiumzellen oder in Art und Typ ihrer Matrix haben Einfluß auf den Blutfluß. (c) Die Endothelzellen sind der dritte wichtige Zelltyp. Ihr Zytoplasma ist zart und stark gefenstert. Sie liegen an der Lumenoberfläche der Basalmembran. Ihre Kerne sind kleiner

als die der Epithelzellen. Bei Forellen ist das Glomerulum kompakt und ihre Zellen liegen dicht beieinander. Dies darf nach HICKMAN und TRUMP (1969) und HENTSCHEL (1977) nicht mit einem pathologischen übermäßigen Zellgehalt verwechselt werden.

Nach KILLEN et al. (1982) gibt es im Glomerulum, außer diesen Zellen, 2 morphologisch unterscheidbare Zonen der extrazellulären Matrix. Das ist einmal die mesangiale Matrix und zum anderen die glomeruläre Basallamina oder Basalmembran, welche das glomeruläre Gefäßsystem vom Harnraum trennt. In der mesangialen Matrix gibt es keine Substrukturen, aber in der glomerulären Basallamina sind neben der Lamina densa noch die Lamina rara externa und die Lamina rara interna zu unterscheiden.

Bei den Untersuchungen wurde besonders in stark veränderten Glomerula eine deutliche Vermehrung der Podozyten festgestellt, die an manchen Stellen den Bowman'schen Raum vollkommen ausfüllen (Abb. 9). Die Zellausläufer der Podozyten weisen untereinander enge Kontaktstellen auf (Desmosomen). Die Endothelzellen ragen in die Kapillarlumen hinein. Zellgrenzen sind nicht feststellbar. Ihr Zellkern ist manchmal nicht sichtbar, und das Zytoplasma enthält elektronendichte Substanzen. Vereinzelt bläschenartige Strukturen mit elektronendichter Umrandung und mäßig elektronendichtem Inhalt waren zwischen den Endothelzellen zu beobachten. Im Zytoplasma der Endothelzellen waren elektronendichte Substanzen. Die Mesangiummatrix enthält im Gegensatz zum histologischen Bild eine erhöhte Anzahl von Mesangiumzellen und einige wenige Makrophagen (Abb. 10). Eine Infiltration von Entzündungszellen konnte nicht beobachtet werden. Die wesentlichen Strukturveränderungen betreffen die Mesangiummatrix und die Basalmembran (Lamina densa) der glomerulären Gefäße. Die schmale Mesangiummatrix zwischen den stark verdickten Kapillarschlingen zeigt besonders starke Strukturveränderungen. In der Matrix bilden die Zellausläufer aus körnigem elektronendichtem Material ein Netz, in dessen Maschen lichterere ebenfalls körniges Material und / oder faseriges Material

liegt. Der Dichteunterschied ist nicht sehr intensiv. Dazwischen sind helle optisch leere Stellen anzutreffen. Es gibt bläschenartige Gebilde unterschiedlicher Größe mit einem homogen elektronendichten Inhalt, der von einem hellen Hof umgeben ist (Abb. 11).

Die Lamina densa ist durchwegs sehr breit und besteht ziemlich einheitlich aus mäßig elektronendichtem, kleinkörnigem Material, das an einigen Stellen etwa um das Doppelte bis Dreifache verbreitert bzw. knotig aufgetrieben ist. Eine Verbreiterung ist besonders an der mesangialen Seite feststellbar (Abb. 12). Durch die Dickenzunahme der kapillären Basalmembran waren die Lumina der Kapillarschlingen deutlich eingeengt. Es existiert noch eine dritte Form von minimalen, aber besonders elektronendichten Ablagerungen. Diese werden schlangenartig ein- oder beidseitig entlang der kapillären Basalmembran festgestellt, wobei sie in Form dunkler Knöpfchen in die Basalmembran hineinreichen. Zwischen diesen Ablagerungen und der Basalmembran befindet sich längs derselben ein sehr schmaler heller Streifen (Abb. 13).

Die Ablagerungen waren mit keiner feststellbaren entzündlichen Reaktion verbunden.

Die Tubuluszellen können weitgehend zerstört sein. In den erhaltenen konnten geschwollene und geplatzte Mitochondrien, ein erweitertes endoplasmatisches Retikulum und einige dichte lysosomenähnliche zytoplasmatische Organellen beobachtet werden. Mäßig elektronendichte körnige Ablagerungen sind entlang der äußeren Seite der Basalmembran der proximalen Tubuli contorti vorhanden, sodaß diese ähnlich homogen verbreitert wie die glomerulären Basalmembranen erscheinen. Entzündungszellen wurden im direkten Bereich der Tubuli nicht beobachtet. Zwischen den Tubuli befinden sich aber Inseln von dicht gepackten Zellen (Erythrozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Fibrozyten), die Gruppen von Glomerula umgeben und außerdem Ansammlungen roter Blutzellen. Innerhalb der Zellhaufen können die von KETTLER (1987) beschriebenen drei phagozytierenden Zelltypen in geringer Zahl beobachtet werden, nämlich (a) makrophagenähnliche Zellen mit randständigen

gem, polymorphen, chromatinarmen, in der Randzone elektronendichtem Kern und ausgeprägtem Nukleolus. (b) Phagozyten mit kleinem, elektronendichtem, exzentrischem Kern mit Nukleolus sind seltener zu finden. (c) Zellen mit großem lichtexzentrischen Kern mit undeutlichem Nukleolus und elektronenlichten kleinblasigem Zytoplasma.

Im Interstitium fallen zwischen dem hämatopoetischen Gewebe an einigen Stellen besonders langgestreckte Fibrozyten auf und dazwischen zahlreiche Melanomakrophagen (Abb. 14).

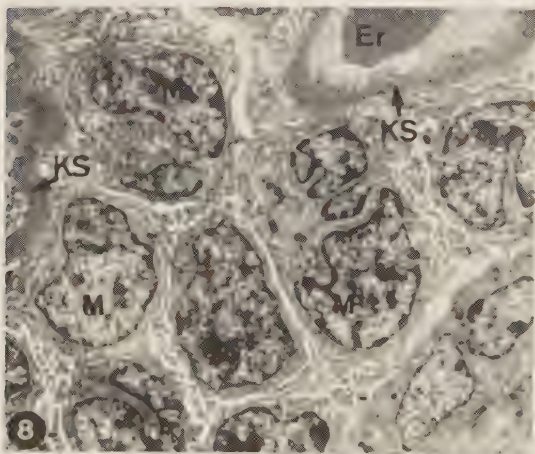
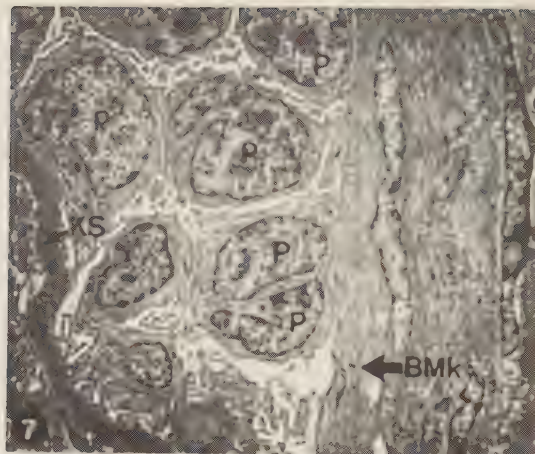


Abb. 7: Podozytenproliferation zwischen Kapillarschlingen
und Basalmembran der Bowman'schen Kapsel.
Podozyt = P; Kapillarschlinge = KS;
Basalmembran der Bowman'schen Kapsel = BMk;
Vergr.: 5100 x

Abb 8: Vermehrung von Mesangiumzellen in der Mesangiummat-
rix.
Mesangium = M; Erythrozyt = Er;
Kapillarschlinge = KS;
Vergr.: 5100 x

Abb. 9: Mesangiumzellen zwischen elektronendichteren kapil-
lären Basalmembranen (Lamina densa):
Im Mesangium wechseln elektronendichtere mit elek-
tronenlichteren Substanzen (➡), optisch leere
Räume mit bläschenartigen Gebilden mit elektronen-
dichtem Inhalt, der von einem Hof umgeben ist
(➤).
Mesangium = M; Lamina densa = Ld;
Endothelzelle = En;
Vergr.: 4100 x

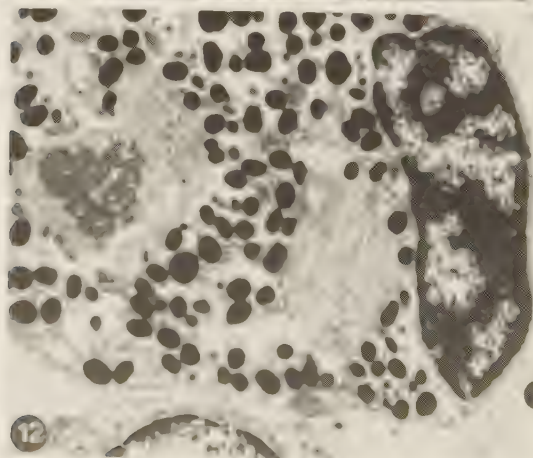
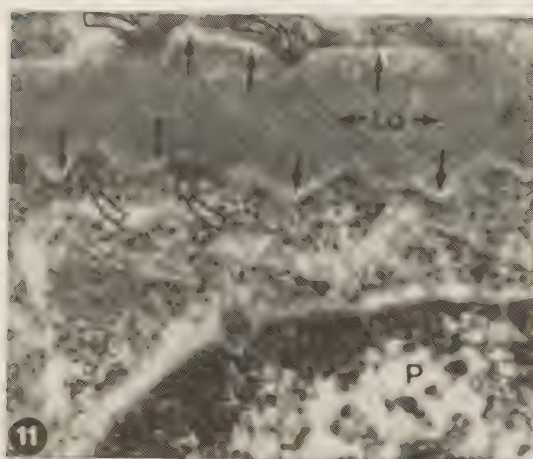
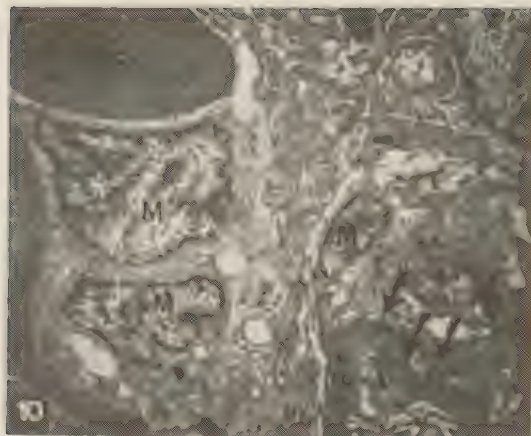


Abb.10: Keulenförmige () Verbreiterung der extrazellulären Matrix (Lamina densa) der kapillären Basalmembran.

Lamina densa = Ld; Mesangium = M; Erythrozyt = Er;

Vergr.: 6800 x

Abb.11: Körnige, mäßig elektronendichte Verbreiterung der Lamina densa der kapillären Basalmembran im Glomerulum:

Ein und beidseitig von den Membranen elektronendichte Schlangenlinien mit knöpfchenartigen Ausbuchtungen () in die Membranen. Das dichte Material wird durch einen helleren Streifen von der Lamina densa getrennt ().

Lamina densa = Ld; Podozyt = P;

Vergr.: 61500 x

Abb.12: Melanomakrophage mit fibrillärem (phagozytiertem) Material und zahlreichen Melanin-Granula.

Vergr.: 14900 x

3.3. Nachweis von Immunglobulinen mittels indirekter Immunfluoreszenz-Technik

3.3.a. Im Kryostatschnitt der Niere

Die Immunfluoreszenz zeigte Immunglobulin-Ablagerungen in feinen bis breiten Bändern entlang der kapillären Basalmembran der Glomerula (Abb. 13). Selten war dieser Prozeß von einer Schwellung der Endothelzellen begleitet. Häufig konnten die Ablagerungen auch im Bereich des parietalen Blattes der Bowman'schen Kapsel beobachtet werden.

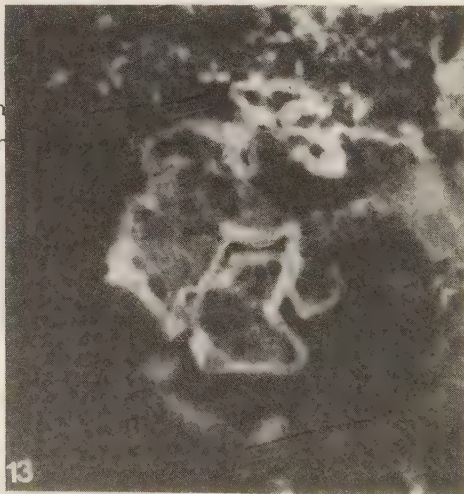
Das Mesangium erschien vielfach ziemlich unbeteiligt. Die Immunfluoreszenz beschränkt sich vorwiegend auf die Peripherie des glomerulären Gefäßknäuels.

Auch an den offensichtlich geschädigten Tubuli konnten Immunglobulinablagerungen in geringerem Umfang in und an der Basalmembran beobachtet werden. Die apikalen Spitzen der Tubuliepithelien, die deutlich PAS-positiv reagierten, fluoreszierten nicht.

Bei den Kontrollen konnte weder an den Glomerula noch an den Tubuli eine Fluoreszenz beobachtet werden.

Abb. 13: Immunfluoreszenz:
Bandartige Ablagerungen von
Immunglobulinen entlang der
glomerulären Kapillarschlingen.

Vergr.: 250 x



3.3.b. Im Paraffinschnitt der Niere

Mit der in III. 2.4.b. beschriebenen Methode konnte im Paraffinschnitt keine Fluoreszenz nachgewiesen werden.

3.4. Nachweis von Renibacterium salmoninarum

Wie aus Tab. 3. ersichtlich konnte bei fünf von sechs infizierten Fischen in Abklatschpräparaten von frischem Nierenmaterial durch Gramfärbung der Erreger nachgewiesen werden. Dies gelang bei den gleichen Tieren auch durch indirekte Immunfluoreszenz (Abb. 14). Mit der zuletzt genannten Methode wurde auch in Abklatschpräparaten der Augen von vier Fischen ein positives Ergebnis erzielt. Demnach war Renibacterium salmoninarum zum Zeitpunkt der vorliegenden Untersuchungen noch immer in den Fischnieren in nachweisbaren Mengen vorhanden.

Tabelle 3: Nachweis von Renibacterium salmoninarum in der Niere der Versuchs- und Kontrollfische mit verschiedenen Methoden.

Fisch Nr.	Nierenabklatsch Indirekte IFT	Erreger Anzüchtung	Gram- färbung	Beweg- lichkeits- test	Oxidase reaktion
--------------	----------------------------------	-----------------------	------------------	------------------------------	---------------------

a) infizierte

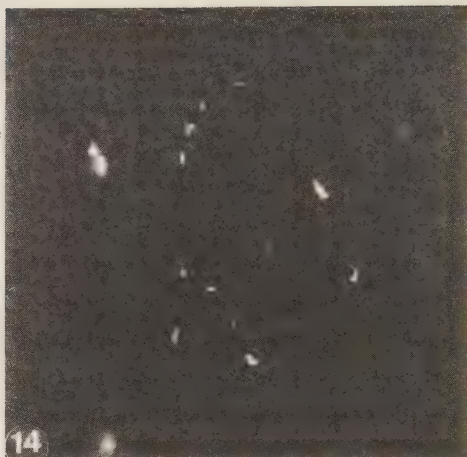
Fische

1	+	-			
2	+	-			
3	+	-			
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+

b) Kontrollfische

7	-	-			
8	-	-			

Abb. 14: Indirekte Immun-
fluoreszenz:
Renibacterium salmoninarum
im Nierenabklatschpräparat
Vergr.: 630 x



3.5. Nachweis von H.A.H Antikörpern gegen R. salmoninarum im Serum von Versuchs- und Kontrollfischen

Nur drei der Versuchsfische wiesen Antikörper mit niedrigen Titern auf. Es bestand keine Korrelation zwischen dem Erreger nachweis und dem Vorhandensein von Antikörpern.

Tabelle 4: H.A.H Antikörpertiter gegen R. salmoninarum in den infizierten und nicht infizierten Fischen.

Fisch Nr.	H.A.H.- Titer
a) infizierte Fische	
1	1:4
2	1:4 - 1:8
3	-
4	1:8
5	-
6	-
b) Kontrollfische	
7	-
8	-

IV. Besprechung der Ergebnisse

Bei experimentell mit Renibacterium salmoninarum infizierten Regenbogenforellen (Salmo gairdneri) wurde 15 Monate p. i. eine chronische membranöse Glomerulonephritis festgestellt. Sie war gekennzeichnet durch eine große Variabilität der Nierenveränderungen, zu denen vor allem eine periglomeruläre Fibrose, Adhäsionen von parietalem und viszeralem Kapselblatt, Schrumpfung und fibrinoide Verquellung der Glomerula-gefäßknäuel sowie degenerative Veränderungen bzw. zystische Erweiterungen der proximalen Tubuli gehörten. Umfangreiche Ablagerungen von PAS-positivem Material wurden in der Mesangiummatrix in und an der Lamina densa der glomerulären Gefäße, aber auch an der Basalmembran und im apikalen Bereich der Tubulusepithelien nachgewiesen. Entzündliche Veränderungen waren im Interstitium zwischen Glomerula und Tubuli wenig ausgeprägt. Die Elektronenmikroskopie bestätigte das Vorhandensein von Matrixablagerungen. Durch Untersuchungen mit Immunfluoreszenz wurde die Beteiligung von Immunglobulinen am pathologischen Geschehen nachgewiesen.

Diese bei den vorliegenden Untersuchungen festgestellten und ähnliche histologische Veränderungen wie z. B. eine diffuse Basalmembranverbreiterung durch subepitheliale und intramembranöse Ablagerungen, Proliferation von Endothelzellen, Vernarbung und Destruktion der Glomerula sowie eine bandartige Immunfluoreszenz entlang den Basalmembranen gelten schon lange als Charakteristika der chronischen Form der membranösen Immunkomplex-Glomerulonephritis (SELL, 1987).

Diese konnte bei Versuchstieren durch wiederholte Injektionen kleiner Antigenmengen in immunisierte Tiere oder durch wiederholte Injektionen von löslichen Immunkomplexen induziert werden. Beim Menschen wurde sie im Zusammenhang mit Lupus erythematodes, Diabetes mellitus und Thyreoiditis beobachtet. Weniger häufig konnten im humanen Bereich Ablagerungen von toxischen Antikörperkomplexen, von viralem Antigen, von Tumorantigen und Antikörpern gegen Tumorantigen als Ursache ermittelt werden. Sicher ist, daß eine Vielzahl

von Antigenen ähnliche Gewebeveränderungen induzieren können (SELL, 1987).

Bei den Mammalia ist neben der chronischen auch eine akute Form der membranösen Glomerulonephritis bekannt (SELL, 1987). Sie entspricht der experimentellen Serumkrankheit bei Versuchstieren. Kennzeichnend ist für das akute Geschehen eine Anhäufung von großen Mengen löslicher Antikörper-Antigenkomplexe auf der epithelialen Seite der glomerulären Basalmembran, die mit der Immunfluoreszenz wie klumpiges Material aussehen. Bei anderen Antigenarten werden bei Mammalia auch granuläre Ablagerungen von Immunkomplexen auf der Endothelseite beobachtet. Durch die Ablagerung der Komplexe ändern sich die elektrostatischen Eigenschaften der Membranen und die Fixation von Komplement. Das bedingt das Auftreten von chemotaktischen Faktoren, die Attraktion von polymorphkernigen Leukozyten und den Abbau der glomerulären Basalmembran durch lysosomale Enzyme. Eine Wirkung von derartigen auch als Mediatoren bezeichneten Faktoren (MEADOW, 1978) konnte weder beim akuten noch beim chronischen Verlauf der BKD nachgewiesen werden. Insgesamt scheint die Infektion mit Renibacterium salmoninarum mehr zu einem protrahierten Verlauf zu neigen.

Die Inkubationszeit ist verhältnismäßig lang. Im Durchschnitt 17,9 - 39,5 Tage. Antikörper werden in nachweisbaren Mengen nach 30 (Oncorhynchus kisutch) bzw. 42 Tage p. i. (Salmo gairdneri) gefunden (SCHAUNER, 1985).

YOUNG und CHAPMAN (1978) versuchten bei experimentell mit Renibacterium salmoninarum infizierten Bachsaiblingen (Salvelinus fontinalis) durch elektronenmikroskopische Untersuchungen die morphologischen Veränderungen in den verschiedenen Krankheitsphasen zu klären. Bei am 18. Tag p. i. getöteten Fischen lagen nur kleine subendotheliale elektronendichte wolkeartige Ablagerungen vor, während dieselben am 44. Tag p. i. subendothelial und mesangial sehr umfangreich und mehr granulär erschienen. Die Lamina densa war mäßig verbreitert und gesprenkelt. Die Mesangiumzellen waren vermehrt. In Endothelzellen sowie in den viszeralen und parie-

tal en Epithelzellen wurden fettähnliche Tröpfchen festgestellt. Nicht strukturierte Bläschen ragten aus den Endothelzellen ins Kapillarlumen. Bakterien lagen in Zytoplasma von Makrophagen vor. Ganz ähnliche Veränderungen wurden bei natürlich erkrankten Salvelinus fontinalis von (KETTLER, 1987) festgestellt. Es fehlen Angaben über das Interstitium. Die Veränderungen haben Ähnlichkeit mit den vorliegenden Ergebnissen. Doch haben beim zeitlichen Fortschreiten des Krankheitsprozesses, der durch die persistierende Infektion bedingt war, der Umfang der Ablagerungen zugenommen und die degenerativen Reaktionen der glomerulären Zellen abgenommen; sie reagieren im wesentlichen immer noch mit Vermehrung. Auch die Untersuchungen von KETTLER (1987) berücksichtigten den zeitlichen Ablauf einer experimentellen BKD Infektion von Äschen (Thymallus thymallus). Kennzeichnend für den akuten Verlauf waren große Mengen von Bakterien extrazellulär und intrazellulär in Makrophagen. Das hämatopoetische Gewebe war reduziert. Im Glomerulum war der Bowman'sche Raum erweitert und enthielt feinstrukturierten Inhalt. Thromben, Endothelschädigungen und Nekrosen waren in den Gefäßknäueln anzutreffen. Im Mesangium und in den kapillären Basalmembranen waren eosinophile und PAS-positive Substanzen abgelagert. Granulome lagen im Interstitium in größerer Anzahl vor. Tubuluszellen zeigten degenerative Veränderungen. Bei chronischem Verlauf waren die Zahl der Bakterien und die Veränderungen im Bereich des hämatopoetischen Gewebes deutlich reduziert, während die Glomerulumkapillaren erweitert waren und die kapillären Basalmembranen und das Mesangium stark PAS-positiv reagierten. Periglomeruläre Fibrosen wurden festgestellt. Auch die von KETTLER (1987) beim chronischen Verlauf festgestellten Veränderungen entsprechen den vorliegenden Befunden. Bei geringer Zahl von Bakterien scheinen die Veränderungen im Interstitium abzunehmen. Die Veränderungen mit Tubuli wichen bei den verschiedenen Verlaufsformen nicht deutlich voneinander ab.

MEYERS und MCPHERSON (1985) berichteten vom Vorliegen einer diffusen chronischen Glomerulonephritis bei moribunden er-

wachsenen Königsachsen (Oncorhynchus tshawytscha), die histologisch durch die Hyperplasie verschiedener glomerulärer Zelltypen, durch kompletten Verschluß des Bowman'schen Raumes, eine Hypertrophie und gelegentlich Nekrosen des glomerulären Gefäßknäuels gekennzeichnet waren. Es bestand eine periglomeruläre Fibrose und Obliteration der glomerulären Kapillarlumina. Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Veränderungen waren die Basalmembranen weitgehend desorganisiert. Ungeklärt blieb, ob die in der extrazellulären glomerulären Matrix angetroffenen vegetativen Stadien eines Sporozoons ursächlich von Bedeutung waren. Bei den im darauf folgenden Jahr, bei der gleichen Fischart, festgestellten Glomerulonephritiden war die Zellproliferation geringer und die Basalmembranen überhaupt nicht in Mitleidenschaft gezogen. In beiden Jahren waren die Veränderungen der proximalen Tubuli gleichermaßen stark ausgeprägt. Da weitere Untersuchungsmethoden nicht angewandt wurden, erscheint es sehr fraglich, ob diese chronische Glomerulonephritis überhaupt den Immunkomplexglomerulonephritiden zugerechnet werden kann. Es gibt jedenfalls deutliche Unterschiede zu den bei BKD beschriebenen Glomerulonephritiden.

Die histologischen Veränderungen der von ELGER und HENTSCHEL (1983) beschriebene Glomerulonephritis der Regenbogenforellen (Salmo gairdneri) im Verlauf der viralen hämorrhagischen Septikämie zeigten Ähnlichkeit mit der Glomerulonephritis bei BKD. Sie waren ebenfalls durch eine große Variabilität der Glomerulaveränderungen ausgezeichnet. Die Verengung des Bowman'schen Raumes war entweder mäßig oder durch Adhäsionen zwischen parietalem und viszeralem Blatt total. Die sich bei PAS Färbung intensiv anfärbenden, deutlich verbreiterten subendothelialen-mesangialen Ablagerungen waren von der Lamina densa der Basalmembranen nicht mehr zu unterscheiden. Im Gegensatz zu den elektronenmikroskopischen Bildern der BKD sind die Ablagerungen bei der Virusseptikämie aber aufgelockerter weniger homogen und enthalten in geometrischen Reihen angeordnete Partikel, bei denen es sich vermutlich um Viruspartikel handelt. Auch die Anwesenheit

von reichlich mononukleären Zellen in den Glomerulakapillaren und in den Kapillarwänden unterscheidet diese pathologischen Veränderungen von denen bei BKD. Immunfluoreszenzuntersuchungen lagen auch hier nicht vor. Doch kann der Vermutung der Autoren zugestimmt werden, daß es sich um unlösliche Makromoleküle handelt, die zwar die Kapillarwand aber nicht die Lamina densa durchdringen konnten und daher subendothelial abgelagert wurden.

Es ist wahrscheinlich, daß sich die bei den verschiedenen Krankheiten der Salmoniden auftretenden Immunkomplexe im Filterungsprozeß der Glomerula unterschiedlich verhalten und zu strukturell und örtlich verschiedenen Ablagerungen führen.

Bei der membranösen Glomerulonephritis der Mammalia gilt die Beteiligung von Immunkomplexen als erwiesen. Beim Fisch wurde sie bisher meistens nur vermutet. Es wurden zwar Ablagerungen in den Matrixräumen festgestellt, doch kann es sich hierbei auch um andere PAS-positive Substanzen (Albumin, Fibrinogen, Fibrin) oder um ortsständige Mukopolysaccharide handeln. Ihre Natur konnte nicht geklärt werden. Durch Verwendung von spezifischen und mit fluoreszierenden Farben markierten Antisera läßt sich aber das Vorhandensein und das Verteilungsmuster von Immunglobulinen feststellen. In vorliegenden Untersuchungen konnten Immunglobuline subendothelial und in verschiedenen Membranen aber nicht in allen PAS-positiven Strukturen nachgewiesen werden. Für die Entstehung von Immunkomplexen ist das Vorhandensein von Antikörpern wesentlich. Nimmt man die Untersuchungen von SCHAUNER (1985) als Indiz für Antikörperbildung, so scheinen hämagglutinierende und hämagglutinationshemmende Antikörper gegen Renibacterium salmoninarum nicht bei allen Fischen gleichmäßig und in gleicher Menge gebildet zu werden. Die meisten Titerstufen liegen bei der BKD der Regenbogenforelle (S. gairdneri) zwischen 4 und 8 (SCHAUNER, 1985).

Nach WILSON und DIXON (1979) können zwei immunpathologische Mechanismen, die zur Glomerulonephritis führen, morphologisch durch die Art der Ablagerungen von Immunglobuli-

nen bzw. Immunkomplexen unterschieden werden. Zirkulierende Immunkomplexe werden primär im Mesangium abgelagert. Erst wenn dessen Aufnahmefähigkeit erschöpft ist, verbreiten sich die Komplexe im subendothelialen Gebiet und lagern sich eng an und in die glomeruläre Basalmembran. Immunkomplexe lagern sich irregulär und bilden granuläre Ausbuchtungen in und entlang des Mesangiums und um die Kapillarwand der Glomerulaschlingen. AGNELLO et al. (1973) sprechen von einer weiteren alternativen Möglichkeit je nach Qualität der Immunkomplextypen. Bei einigen Krankheiten (nicht nur bei der idiopathischen Membran GN) gibt es eine sehr kleine Klasse von Komplexen mit einer so starken Affinität zur glomerulären Basalmembran, daß sie sich unter Umgehung des Mesangiums direkt auf der epithelialen Seite der glomerulären Basalmembran ablagern. Antikörper gegen Glomerulamembranen oder Tubulimembranen verteilen sich einheitlich entlang der Basalmembran und bilden ein typisches lineares Muster. Nach den vorliegenden Ergebnissen der Immunfluoreszenz befinden sich die Immunglobulinablagerungen in feinen oder breiten Bändern entlang den kapillären Basalmembranen des Nierenkörperchens und im geringem Umfang an der epithelialen Basalmembran der Tubuli. Es handelt sich also um Antikörper gegen Membranbestandteile (AGNELLO et al., 1973). Die elektronenmikroskopischen Befunde erhärten die Existenz von mäßig elektronendichten Ablagerungen innerhalb und von elektronendichten Ablagerungen entlang der kapillären Basalmembranen.

Der Nachweis der Identität der Antigenkomponenten von Immunkomplexen blieb bisher meist unaufgeklärt. In den vorliegenden Fällen besteht die große Wahrscheinlichkeit, daß Renibacterium salmoninarum oder ein Bestandteil des Bakteriums als Antigenteil beteiligt ist. Dafür spricht der positive Erregernachweis im Nierenabklatsch und im Elektronenmikroskop.

Viele Faktoren bestimmen die Ablagerung von zirkulierenden Immunkomplexen. Bei Versuchstieren wurde die Bedeutung der Größe eines Komplexes wiederholt festgestellt. Diese ist wiederum vom Verhältnis der Antigenmenge zur Antikörpermenge

abhängig. Antigen im mäßigen Überschuß bewirkt die Bildung von löslichen Immunglobulinen mittlerer Größe, die bevorzugt abgelagert werden. Sie werden rasch phagozytiert, fixieren Komplement und sind phlogogen. Diese Art von Komplexen gilt als Auslöser von Nephritis und Arteriitis. Ausnahmsweise soll auch beim Vorliegen eines sehr großen Antigens, das durch viele Antikörper zu einem großen Komplex wird, Nephritis entstehen können. Komplexe mittlerer Größe entgehen den Blutphagozyten und dem R. E. System und werden im Mesangium zwischen den Kapillaren und außerhalb des Kapillarendothels abgelagert. Sie werden unter den Endothelzellen angetroffen und können durch die Kapillarwand wandern und eventuell zu großen Aggregaten akkumulieren (WILSON und DIXON, 1979). Nachdem niedrige HAH Antikörpertiter bei der Mehrzahl der Versuchsfische und bei Feldfischen gefunden wurden (SCHAU-
NER, 1985), könnte das ein Hinweis sein, daß bei den Regenbogenforellen (*S. gairdneri*) ein Antigenüberschuß, also mittelgroße Immunkomplexe vorhanden waren.

Die tubulären Veränderungen können durch Immunkomplexe unterschiedlicher Spezifität und mit Hilfe von Mediatoren (Komplement, Leukozyten etc.) entstanden sein. Die Gewebeeränderungen im Tubulusbereich sehen anders aus, weil die Tubuli von interstitiellem Gewebe und einem kapillaren Netz umgeben sind. Die tubuläre Basalmembran wird durch Immunkomplexe meist gleichzeitig wie die Glomerulabasalmembran angegriffen.

Für die Entstehung von Gewebeschäden bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis werden vielfach Mediatoren verantwortlich gemacht (MEADOWS, 1978). Das sind Wirtsfaktoren, die durch eine immunologische Reaktion aktiviert werden. Die meisten Mediatoren, die pathologische Glomerulaveränderungen verursachen, werden bei Aktivierung von Komplement frei. Sie können mit Wirtszellen und Proteinen reagieren, die örtliche Kapillarpermeabilität erhöhen oder eine chemotaktische Wirkung auf polymorphkernige Leukozyten ausüben. Immunkomplexe können in vitro auch die Blutgerinnung beeinflussen (ROBBINS und STETSON, 1959). Es gibt Berichte über die Aktivierung

des Kininsystems durch Antigen-Antikörper-Komplexe (KAPLAN et al., 1971). Vermutlich hängt die Wirkung der Mediatoren auch von der Natur des beteiligten Antigens ab, welches auch Einfluß auf die Immunkomplexbildung und -ablagerung nimmt. Für die endgültige Klärung der Pathogenese der chronischen membranösen Glomerulonephritis bei der BKD der Regenbogenforellen (S. gairdneri) bedarf es weiterer Untersuchungen über die Beteiligung und Bedeutung von den durch die Immunkomplexe aktivierten Mediatoren.

V. Zusammenfassung

Durch histologische, elektronenmikroskopische und Immunfluoreszenz-Untersuchungen konnte bei experimentell mit Renibacterium salmoninarum vor 15 Monaten infizierten Regenbogenforellen (Salmo gairdneri) das Vorliegen einer postinfektiösen chronischen membranösen Glomerulonephritis festgestellt werden. In der Niere konnte durch Immunfluoreszenz und Anzüchtung der Erreger nachgewiesen werden. Es bestanden außerdem bei einigen Fischen niedrige HAH-Titer gegen Renibacterium salmoninarum.

Folgende Glomerulaveränderungen waren für die Nephritis kennzeichnend:

Es bestand eine periglomeruläre Fibrose. In den Glomerula wurden sowohl eine Dilatation des Bowman'schen Raumes nach Gefäßknäuelatrophie, als auch eine Verwachsung des parietalen und viszeralen Kapselblattes festgestellt. PAS-positives Material war umfangreich in den Glomerula abgelagert. Immunhistologisch wurden lineare Immunglobulinablagerungen entlang der kapillären Basalmembran und an der Basalmembran der proximalen Tubuli contorti festgestellt. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben eine Einlagerung von mäßig elektronendichtem Material im Mesangium und eine intensive Verbreiterung der Basalmembran der Glomerulumschlingen durch mäßig elektronendichtes Material. Während im Mesangium keine eingelagerten Substanzen festgestellt wurden, bestand eine lineare Fluoreszenz entlang der Lamina densa der Glomerulumkapillaren.

Vermehrt Melanomakrophagen konnten nur im Interstitium beobachtet werden.

Summary

On the pathogenesis of glomerulonephritis in rainbow trout (Salmo gairdneri) with Bacterial Kidney Disease (BKD).

Rainbow trout (S. gairdneri) experimentally infected with Renibacterium salmoninarum had a postinfectious chronic membranous glomerulonephritis by histological, electronmicroscopical and immunhistological studies. Presence of bacteria in kidney could be shown by cultivation and IFT.

Only low HAH-titer against R. salmoninarum were found.

The following alterations were seen in glomerula:

A periglomerular fibrosis, dilatation of the Bowman's space due to atrophy of glomerular capillaries; fusion of parietal and visceral capillary layers. PAS-positiv material was deposited in the glomerular membranes.

By immunhistological technique linear immunglobulin-deposits along the capillary basement membrane of glomerula and partially of tubules were observed.

Electronmicroscopic studies showed in the mesangium deposits of moderate electrondense material and an intensive thickening of capillary basement membranes by a moderate electrondense material.

Number of melanomacrophages were increased in the interstitium.

VI. Literaturverzeichnis

AGIUS, C. (1979):

The role of melano-makrophage centres in iron storage in normal and diseased fish.

J. Fish Dis. 2, 337 - 343

AGIUS, C. (1980):

Phylogenetic development of melano-makrophage centres in fish.

J. Zool. 191, 11 - 32

AGNELLO, V., D. KOFFER and H. G. KUNKEL (1973)

Immune complex systems in the nephritis of systemic lupus erythematosus.

Kid. Int. 3, 90

ALLISON, L. N. (1958):

Multiple sulfa therapy of kidney disease among brook trout.

Prog. Fish Cult. 20, 66 - 68

AMAND, D. F., and K. A. JOHNSON (1984):

Evidence for lacking of antigenic competition among various combinations of *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida* and *Renibacterium salmoninarum* bacterins when administered to salmonid fishes.

J. Fish Dis. 7, 293 - 299

AMLACHER, E. (1986):

Taschenbuch der Fischkrankheiten.

5. Auflage, VEB, Gustav Fischer Verlag, Jena

- AUSTIN, B., and D. A. AUSTIN (1986):
Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish.
Ellis Horwood, Chichester.
- AUSTIN, B., T. M. EMBLEY and M. GOODFELLOW (1983):
Selective isolation of *Renibacterium salmoninarum*.
FEMS Microbiol. Lett. 17, 111 - 114
- AUSTIN, B., and J. RAYMENT (1985):
Epizootology of *Renibacterium salmoninarum*, the causal agent of bacterial kidney disease in salmonid fish.
J. Fish Dis. 8, 505 -- 509
- AUSTIN, B. and C. J. RODGERS (1980):
Diversity among strains causing bacterial kidney disease in salmonid fish.
Current Mikro. 3, 231 - 235
- ANSTEE, D. J., P. D. HOLT and G. I. PARDOE (1973):
Agglutinins from fish ova defining blood groups B and P.
Vox Sang. 25, 347
- BANNER, C. R., J. J. LONG, J. L. FRYFR and J. S. ROHOVEC (1986):
Occurrence of salmonid fish infected with *Renibacterium salmoninarum* in the pacific ocean.
J. Fish Dis. 8, 273 - 275
- BAUDIN-LAURENCIN, F., M. VIGNEULLE et M. MEVEL (1977):
Premieres observations sur la Corynebacterioses des salmonides en Bretagne.
Bull. Off. Int. Epiz. 87, 505 -507

- BELGING, D. L. and B. MERRILL (1935):
A preliminary report upon a hatchery disease of the salmonidae.
Trans. Amer. Fish. Soc. 65, 76 - 84
- BELL, G. R. (1961):
Two epidemics of apparent kidney disease in cultured pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*).
J. Fish. Res. Board Can. 18, 559 - 562
- BELL, G. R., D. A. HIGGS and G. S. TRAXLER (1984):
The effect of dietary ascorbate, zinc and manganese on the development of experimentally induced bacterial kidney disease in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*).
Aquaculture 36, 293 - 311
- BENDELE, R. A., Jr. and G. W. KLONTZ (1975):
Histopathology of teleost kidney disease.
In: Pathology of Fishes, eds. W. E., Ribelin, and G. Migaki
The University of Wisconsin Press, London.
- BRUNO, D. W. (1986):
Histopathology of bacterial kidney disease in laboratory infected rainbow trout, *salmo gairdneri* Richardson, and atlantic salmon, *salmo salar* L., with reference to naturally infected fish.
J. Fish Dis. 9, 523 - 537
- BRUNO, D. W. and A. L. S. MUNRO (1982):
Detection of the causative agent of bacterial kidney disease.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 2, 10 - 12

- BRUNO, D. W. and A. L. S. MUNRO (1986 a):
Uniformity in the biochemical properties of *Renibacterium salmoninarum* isolates obtained from several sources.
FEMS Microbiol. Lett. 33, 247 - 250
- BRUNO, D. W. and A. L. S. MUNRO (1986 b):
Haematological assessment of rainbow trout, *salmo gairdneri* Richardson, and atlantic salmon, *salmo salar* L., infected with *Renibacterium salmoninarum*.
J. Fish Dis. 9, 195 - 204
- BULLOCK, G. L. , D. A. CONROY and S. F. SNIESZKO (1971):
Bacterial Diseases of Fishes.
In: *Diseases of Fishes*, eds. S. F. Snieszko and H. R. Axelrod, Book 2A:
T. F. H. Publications. Inc., Neptune, N. J.
- BULLOCK, G. L., B. R. GRIFFIN and H. M. STUCKEY (1980):
Detection of *Corynebacterium salmoninus* by direct fluorescent antibody test.
Can. J. Fish Aquatic Sci. 37, 719 - 721
- BULLOCK, G. L. and S. F. SNIESZKO (1969):
Bacteria in blood and kidney of apparently healthy trout.
Trans. Amer. Fish. Soc. 98, 268 - 271
- BULLOCK, G. L. and H. M. STUCKEY (1975):
Fluorescent antibody identification and detection of the corynebacterium causing kidney diseases of salmonids.
J. Fish. Res. Board Can. 32, 2224 - 2227

- BULLOCK, G. L., H. M. STUCKEY and P. K. CHEN (1974):
Corynebacterial kidney disease of salmonids: growth
and serological studies on the causative bacterium.
Appl. Mikrobiol. 28, 811 - 818
- BULLOCK, G. L., H. M. STUCKEY and D. MULCAHY (1978):
Corynebacterial kidney disease: egg transmission
following iodophore disinfection.
Fish Health News 76, 51 - 52
- BULLOCK, G. L., H. M. STUCKEY and K. WOLF (1975):
Bacterial kidney disease of salmonid fishes.
US Dept. Inter. Fish Wildl. Serv. Fish. Dis. Leaflet.
No. 41
- CHEN, P. K., G. L. BULLOCK, H. M. STUCKEY and A. C. BULLOCK
(1974):
Serological diagnosis of corynebacterial kidney di-
sease of salmonids.
J. Fish. Res. Board Can. 31, 1939 - 1940
- CHILLER, J. M., H. O. HODGINS, V. C. CHAMBERS and R. S.
WEISER (1969 a):
Antibody response in rainbow trout (*salmo gairdne-
ri*) I. Immunocompetent cells in the spleen and an-
terior kidney.
J. Immunol. 102, 1193 - 1201
- CHILLER, J. M., H. O. HODGINS and R. S. WEISER (1969 b):
Antibody response in rainbow trout (*salmo gairdne-
ri*) II. Studies on the kinetics of development of
antibody-producing cells and on complement and
natural hemolysin.
J. Immunol. 102, 1202 - 1207

CHURG, J. (1968):

Electron microscopic aspects of renal pathology.
In: Structural basis of renal disease, ed. E. L.
Becker.
Harper and Row, New York

CIPRIANO, R. C., C. E. STARLIPER and J. H. SCHACHTE (1985):

Comparative sensitivity of diagnostic procedures
used to detect bacterial kidney disease in salmo-
nid fishes.
J. Wildl. Dis. 21, 144 - 148

CLEM, L.W. and W. E. MCLEAN(1975):

Phylogeny of immunoglobulin structure and function.
VII. Monomeric and tetrameric immunoglobulins of
the margate, a marine teleost fish.
J. Immunol. 29, 791 - 799

COLLINS, M. D. (1982):

Lipid composition of *Renibacterium salmoninarum*
(Sanders and Fryer).
FEMS Microbiol. Lett. 13, 295 - 297

CORBEL, M. J. (1975):

The immune response in fish: a review.
J. Fish Biol. 7, 539 - 563

COULSON, J. J (1977):

Studies on bacterial kidney disease in salmonids.
MSc Thesis, University Guelph, Guelph, Ontario, Ca-
nada.

CUSHING, J. E. (1945):

A comparative study of complement. I. specific in-
activation of the components.
J. Immunol. 50, 61 - 89

- DAHME, E. und E. WEISS (1978):
 Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der
 Haustiere. S. 211 - 214
 2.Aufl. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- DALY, J. G. and R. M. W. STEVENSON (1985):
 Charcoal agar, a new growth medium for the fish di-
 sease bacterium *Renibacterium salmoninarum*.
 Appl. Environ. Microbiol. 50, 868 - 871
- DIXON, P. F. (1986):
 Detection of *Renibacterium salmoninarum* by the
 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
 J. Appl. Ichthyol. 3, 77 - 82
- DORSON, M. (1972):
 Some characteristics of antibodies in the primary
 immune response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*).
 In: Diseases of Fish, ed. L. E Mawdesley-Thomas,
 Academic Press and the Zoological Society, New
 York, London
- DORSON, M., A. BARDE and P. DE KINKELIN (1975):
 Egypted virus induced rainbow trout interferon:
 some physiochemical properties.
 Ann. Microbiol. 126 B, 485 - 489
- EARP, B. J., C. H. ELLIS and E. J. ORDAL (1953):
 Kidney disease in young salmon.
 Wash. Dep. Fish. Spec. Rep. Ser. 1., 72 p
- EHLINGER, N. F. (1963):
 Kidney disease in lake trout complicated by lympho-
 sarcoma.
 Prog. Fish-Cult. 23, 3 - 7

ELLIS, A. E. (1977):

The leucocytes of fish: a review.

J. Fish Biol. 11, 453 - 492

ELLIS, A. E. (1980):

Antigen trapping in the spleen and kidney of the plaice (*Pleuronectes platessa*).

J. Fish Dis. 3, 413 - 426

ELLIS, A. E. (1982):

Difference between the immune mechanism of fish and higher vertebrates.

In: Microbial Diseases of Fish, ed. R. J. Roberts
Spezial Publications of the Society for General
Microbiology, No. 9, Academic Press, London

ELLIS, A. E., A. L. S. MUNRO and R. J. ROBERTS (1976):

Defence mechanisms in fish. 1. A study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in the plaice (*Pleuronectes platessa*).

J. Fish Biol. 8, 67 - 78

ELLIS, A. E., A. J. NOVOTNY and L. W. HARRELL (1978):

Case report of kidney disease in a wild chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in the sea.

J. Wildl. Dis. 14, 120 - 123

ELGER, M. und H. HENTSCHEL (1983):

Glomerular disease in cultured rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Richardson suffering from presumptive chronic viral haemorrhagic septicaemia.

J. Fish Dis. 6, 211 - 229

ELGER, B., M. NEUKIRCH und H. HENTSCHEL (1986):

The kidney of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Richardson in the acute phase of viral haemorrhagic septicaemia: in vivo experiments on the renal excretion of fluid, electrolytes and protein.

J. Fish Dis. 9, 381 - 392

EMBLEY, T. M., M. GOODFELLOW and B. AUSTIN (1982):

A semi-defined growth medium for *Renibacterium salmoninarum*.

FEMS Microbiol. Lett. 14, 299 - 301

EMBLEY, T. M., M. GOODFELLOW, D. E. MINNIKIN and B. AUSTIN (1983):

Fatty acid, isoprenoid quinone and polar lipid composition in the classification of *Renibacterium salmoninarum*.

J. Appl. Bacteriol. 55, 31 - 37

EVELYN, T. P. T. (1971):

The agglutinin response in sockeye salmon vaccinated intraperitoneally with a heat-killed preparation of the bacterium responsible for salmonid kidney disease.

J. Wildl. Dis. 7, 328 - 335

EVELYN, T. P. T. (1977):

An improved growth medium for the kidney bacterium and some notes in using the medium.

Bull. Off. Int. Epiz. 87, 511 - 513

EVELYN, T. P. T., G. E. HOSKINS and G. R. BELL (1973):

First record of bacterial kidney in an apparently wild salmonid in British Columbia.

J. Fish. Res. Board Can. 30, 1578 - 1580

EVELYN, T. P. T., J. E. KETCHESON and L. PROSPERI-PORTA
(1981):

The clinical significance of immunofluorescence-based diagnosis of the bacterial kidney disease carrier.

Fish Pathol. 15, 293 - 300

EVELYN, T. P. T., J. E. KETCHESON and L. PROSPERI-PORTA
(1984):

Further evidence for the presence of Renibacterium salmoninarum in salmonid eggs and for the failure of povidine-iodine to reduce intra-ovum infection in water-hardened eggs.

J. Fish Dis. 7, 173 - 182

EVELYN, T. P. T., L. PROSPERI-PORTA and J. E. KETCHESON
(1986 a):

Persistence of the kidney-disease bacterium, Renibacterium, in coho salmon, Oncorhynchus kisutch (Walbaum), eggs treated during and after water-hardening with povidone-iodine.

J. Fish Dis. 9, 461 - 464

EVELYN, T. P. T., L. PROSPERI-PORTA and J. E. KETCHESON
(1986 b):

Experimental intra-ovum infection of salmonid eggs with Renibacterium salmoninarum and vertical transmission of the pathogen with such eggs despite their treatment with erythromycin.

Dis. Aquat. Organ. 1, 197 - 202

FIEDLER, F. and R. DRAXL (1986):

Biochemical and immunochemical properties of the cell surface of Renibacterium salmoninarum.

J. Bacteriol. 168, 799 - 804

FIJAN, N. (1977):

Corynebacteriosis (Dee Disease, Kidney Disease) of salmonids in Yugoslavia.

Bull. Off. Int. Epiz. 87, 509

FLETCHER, T. C. (1986):

Modulation of nonspecific host defenses in fish.

Vet. Immunol. Immunopathol. 12, 59 - 67

FLETCHER, T. C. and P. T. GRANT (1969):

Immunoglobulins in the serum and mucus of the plaice (*Pleuronectes platessa*).

Biochem. J. 115, 65

FLETCHER, T. C. and A. WHITE (1973):

Antibody production in the plaice after oral and parental immunization with *Vibrio anguillarum* antigens.

Aquaculture 1, 417 - 428

FRANTSI, C., T. C. FLEWELLING and K. G. TIDSWELL (1975):

Investigations on corynebacterial kidney disease and *Diplostomulum* sp. (eye-fluke) at Margee Hatchery, 1972-1973, Tech. Rep. Ser. No. Mar/T-75-9. Res. Develop. Branch, Fish and Marine Serv., Dept. Environ. Halifax, Nova Scotia, Canada 30 p

FRYER, J. L. and J. E. SANDERS (1981):

Bacterial kidney disease of salmonid fish.

Ann. Rev. Microbiol. 35, 273 - 298

GHITTINO, P., S. ANDRUETTO and E. VIGLIAN (1977):

Recent finding in trout kidney pathology in Italy.

Bull. Off. Int. Epiz. 87, 491 - 493

GOMORI, G. (1837):

Silver impregnation of reticulum in paraffin section.

Amer. J. Path. 13, 993 - 1002

GOODFELLOW, M., T. M. EMBLEY and B. AUSTIN (1985):

Numerical taxonomy and emended description of *Renibacterium salmoninarum*.

J. Gen. Microbiol. 131, 2739 - 2752

GRACE, M. F., J. W. BOTHAM and M. J. MANNING (1981):

Ontogeny of lymphoid organ function in fish.

In: Aspects of Developmental and Comparative Immunology I, ed. J. B. Solomon

Pergamon Press, Oxford

GRACE, M. F. and M. J. MANNING (1980):

Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson 1836.

Dev. Comp. Immunol. 4, 225 - 264

GRAVELL, M. and R. S. MALSBERGER (1965):

A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*).

Ann. N. Y. Acad. Sci. 126, 555 - 565

HAHNEL, G. B., R. W. GOULD and E. S. Boatman (1983):

Serological comparison of selected isolates of *Aeromonas salmonicida* sp. *salmonicida*.

J. Fish Dis. 6, 1 - 11

HENDRICKS, J. D. and S. L. LEEK (1975):

Kidney disease postorbital lesion in spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*).

Trans. Amer. Fish. Soc. 104, 805 - 807

HENTSCHEL, H. (1977):

The kidney of *Sinachia spinachia* (L.) Flem. (Gasterosteidae, Pisces). I. Investigations of juvenile sticklebacks: anatomy, circulation and fine structure.

Zeitschrift f. mikroskop.-anat. Forschung 91, 4

HERMAN, R. L. (1970):

Effects of gossypol on rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson.

J. Fish Biol. 2, 293 - 303

HICKMAN, C. P. and B. F. TRUMP (1969):

The kidney.

In: Fish Physiology, eds. Hoar W. S. and D. J. Randall, Vol. 1. 99 - 239

New York and London: Academic Press

HILDEMANN, W. H. and G. H. THOENES (1969):

Immunological responses of pacific hagfish.

Transplantation 7, 506 - 521

HODGINS, H. O., R. S. WEISER and G. J. RIDGEWAY (1967):

The nature of antibodies and the immune response in rainbow trout (*Salmo gairdneri*).

J. Immunol. 99, 534 - 544

HOFFMANN, R., W. POPP and S. VAN DE GRAAF (1984):

Atypical BKD predominantly causing ocular and skin lesion.

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 4, 7 - 9

HOLT, P. D. J. and D. J. ANSTEE (1975):

A natural anti-A agglutinin in the serum of the brown trout (*Salmo trutta*).

Vox Sang. 29, 286

HUNN, J. B. (1964):

Some patho-physiological effects of bacterial kidney disease in brook trout.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 117, 383 - 385

INGRAM, G. A. and J. B. ALEXANDER (1980):

The immune response of the brown trout, *Salmo trutta*, to lipopolysaccharide.

J. Fish Biol. 16, 181

IRWIN, M. J. and S. L. KAATTARI (1986):

Salmonid B lymphocytes demonstrate organ dependent functional heterogeneity.

Vet. Immunol. Immunopathol. 12, 39 - 45

IWAMA, G. K. (1980):

Incubation times resulting from experimental injections of kidney disease bacteria into juvenile coho salmon.

Pro. Fish Cult. 42, 182 - 183

IWAMA, G. K. and G. L. GREER (1980):

Effect of bacterial infection on the toxicity of sodium pentachlorophenatę to juvenile coho salmon.

Trans. Amer. Fish. Soc. 109, 290 - 292

KAATTARI, S. L. and M. J. IRWIN (1985):

Salmonid spleen and anterior kidney harbor populations of lymphocytes with different B cell repertoires.

Dev. Comp. Immunol. 9, 433 - 44

KAPLAN, A. O., J. SPRAGG, and K. F. AUSTIN (1971):

The immunologic activation of the bradykinin-forming system in man.

In: Biochemistry of the acute allergic reactions, eds. K. F. Austin and E. L. Becker. Oxford

KETTLER, S. (1987):

Histologische Untersuchungen zur Bakteriellen Nierenerkrankung (BKD, bacterial kidney disease) der Salmoniden unter besonderer Berücksichtigung der Äsche (*Thymallus thymallus*).
Vet.-med. Diss., München

KETTLER, S., C. PFEIL-PUTZIEN and R. HOFFMANN (1986):

Infection of grayling (*Tymallus thymallus*) with the agent of bacterial kidney disease.

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 5, 207 - 213

KIMURA, T. (1978):

Bacterial kidney disease of salmonids.

Fish Pathol. 13, 43 - 52

KIMURA, T. and T. AWAKURA (1977):

Bacterial kidney disease of salmonids: First observation in Japan.

Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 43, 143 - 150

KIMURA, T. and M. YOSHIMIZU (1981 a):

Rapid method for detection of bacterial kidney disease of salmonid (BKD) by coagglutination of antibody sensitized protein A-containing Staphylococci.

Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 47, 1173 - 1183

KIMURA, T. and M. YOSHIMIZU (1981 b):

A coagglutination test with antibody-sensitized Staphylococci for rapid and simple diagnosis of bacterial kidney disease (BKD).

International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines, Leetown, W. Va., U. S. A. 1981, Develop. biol. Standard. 49, 135 - 148
(S.Karger, Basel 1981)

DE KINKELIN, P. and M. DORSON (1973):

Interferon production on rainbow trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with egtved virus.

J. gen. Virol. 19, 125 - 127

DE KINKELIN, P. (1974):

Corynebacteriose de salmonides: premiere observation en France.

Bull. Franc. de Piscicult. 254, 3 - 8

KILLEN, P. D., C. MELCION, J. F. BONADIO, L. MOREL-MAROGER and G. E. STRIKER (1982):

Glomerular response to immunologic injury, studies in progression.

Springer Sem. Immunopathol. 5, 297 - 320

KLASSEN, J., G. A. ANDRES, J. C. BRENNAN and R. T. MCCLUSKY (1972):

An immunologic renal tubular lesion in man.

Clin. Immunol. Immunopathol. 1, 69 - 83

KLONTZ, G. W., A. W. ROURKE and W. ECKBLAD (1986):

The immune response during proliferative kidney disease in rainbow trout: a case history.

Vet. Immunol. Immunopathol. 12, 387 - 393

KLONTZ, G. W. (1982):

Bacterial kidney disease in salmonids. An overview. The International Symposium on the Antigens of Fish Pathogens: Development and Production of Vaccines and Serodiagnostics. (May 1982, Talloires/France)

KLONTZ, G. W., W. T. YASUTAKE and T. J. PARISAT (1965):

Virus disease of the salmonidae in Western United States. III. Immunopathological aspects.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 126, 531 - 542

KOVACS, N. (1956):

Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction.

Nature, Lond. 168, 703

KUSSER, W. and F. FIEDLER (1983):

Murein type and polysaccharide composition of cell walls from *Renibacterium salmoninarum*.

FEMS Microbiol. Lett. 20, 67 - 69

LAIDLER, L. A. (1980):

Detection and identification of the bacterial kidney disease (BKD) organism by the indirekt fluorescent antibody technique.

J. Fish Dis. 3, 67 - 69

LALL, S. P., W. D. PATERSON, J. A. HINES and N. J. ADAMS

(1985):

Control of bacterial kidney disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by dietary modification.

J. Fish Dis. 8, 113 - 124

LALLIER, R., G. OLIVIER, P. CHARTIER, C. TURCOTTE, DION

B. et P. PAULHUS (1981):

Presence de la maladie bacterienne du rein chez les salmonides au Quebec.

Can. Vet. J. 22, 226 - 229

LAMBERT, P. H. and F. J. DIXON (1968):

Pathogenesis of the glomerulonephritis of NZB/W mice.

J. Exp. Med. 127, 507

LANGVAD, F., O. PEDERSEN and K. ENGJOM (1985):

A fungal disease caused by *Exophiala* sp. nova in farmed Atlantic salmon in Western Norway.

Fish Shellfish Pathol. 34, 323 - 328

LIEFMANN, H. (1911):

Über die Hämolysine der Kaltblüterseren.

Berl. klin. Wschr. 48, 1682

LITMANN, G. W. (1975):

Physical properties of immunoglobulins of lower species: A comparison with immunoglobulins of mammals.

In: Comparative Immunology, ed. J. J. Marchalonis, Blackwell, Oxford

LOBB, C. J. (1976):

Salmonid kidney disease: Diagnosis by immunodiffusion.

MSc Thesis, Utah State University

LUFT, J. H. (1961):

Improvement in epoxy resin embedding methods.

J. Biophys. Biochem. Cytology 9, 409 - 414

MACKIE, T. J., J. A. ARKWRIGHT, T. E. PRICE-TANNATT, J. C.

MOTTRAM, W. D. JOHNSON and W. J. M. MENZIES (1933):

Furunculosis Committee Report, Second Interim. Edinburgh: HMSO.

MACKIE, T. J. and C. S. WARDLE (1971):

Electrophoretic identification of lymph from muscle tissue of plaice (*Pleuronectes platessa* L.).

Int. J. Biochem. 2, 409 - 413

MACLEAN, D. G. and W. G. YODER (1970):

Kidney disease among Michigan salmon in 1967.

Prog. Fish Cult. 32, 26 - 30

- MANNIK, M., L. Y. C. AGODOA and K. A. DAVID (1983):
Rearrangement of immune complexes in glomeruli
leads to persistence and development of electro-
dense deposits.
J. Exp. Med. 157, 1516 - 1527
- MANNING, M. J., M. F. GRACE and C. J. SECOMBES (1982):
Developmental aspects of immunity and tolerance in
fish.
In: Diseases of Fish, ed. R. J. Roberts,
Academic Press, London
- MEADOWS, R. (1978):
Renal Histopathology. 2. Ed.
Oxford Univ. Press New York, Melbourn
- MEYERS, T. R. and B. P. MCPHERSON (1985):
Chronic glomerulonephritis in returning fall chi-
nook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum),
from the Rogue River, Oregon.
J. Fish Dis. 8, 407 - 416
- MCCARTHY, D. H. (1975):
Detection of *Aeromonas salmonicida* antigen in di-
seased fish tissue.
J. Gen. Microbiol. 88, 384 - 386
- MCCARTHY, D. H. and K. A. JOHNSON (1982):
A serotypic survey and cross-protection test of
North American field isolates of *Yersinia ruckeri*.
J. Fish Dis. 5, 323 - 328
- MCKINNEY, E. C., S. B. SMITH, H. G. HAINES and M. M. SIGEL
(1977):
Phagocytosis by fish cells.
J. Reticuloendothelial Soc. 21, 89 - 95

- MCPHAUL, J. J. jr, R. W. NEWCOMB, J. D. MULLINS, A. L. THOMPSON jr., R. E. LORDON and P. W. ROGERS (1974):
Participation of immunoglobulin E (IgE) in immun-mediated glomerulonephritis.
Kid. Int. 5, 2922 - 299
- MILLAN, L. M. (1977):
New diseases in salmon culture in Spain.
Bull. Off. Int. Epiz. 87, 515 - 516
- MILLER, N. W., R. C. SIZEMORE and L. W. CLEM (1985):
Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: The cellular requirements for in vitro antibody responses of channel catfish leucocytes.
J. Immunol. 134, 2884 - 2888
- MITCHUM, D. L., L. E. SHERMAN and G. T. BAXTER (1979):
Bacterial kidney disease in feral populations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*), brown trout (*Salmon trutta*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*).
J. Fish. Res. Board Can. 36, 1370 - 1376
- MITCHUM, D. L. and L. E. SHERMAN (1981):
Transmission of bacterial kidney disease from wild to stocked hatchery trout.
Can. J. Fish. Aquat. Sci. 38, 547 - 551
- MÜLLER, F. (1986):
Serologische Untersuchungen über die Verbreitung der Bakteriellen Nierenerkrankung (BKD) im Süden Baden-Württembergs.
Vet. -med. Diss., München

OIE, K. H. and P. C. LOH (1969):

Reovirus Type II: Induction of viral resistance and interferon production in fathead minnow cells.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 136, 369 - 373

OLLENSCHLAGER, B. (1978):

Immunreaktion beim Fisch.

In: Tagungsber. d. D V G e. V. - Fachgruppe Tierseuchenrecht, Diagnose und Bekämpfung von Fischkrankheiten, München.

ORDAL, E. J. and B. J. EARP (1956):

Cultivation and transmission of etiological agent of kidney disease in salmonid fishes.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92, 85 - 88

OUCHTERLONY, Ö. (1958):

Diffusion-in-gel methods for immunological analysis.

In: Progress in Allergy, ed. P. Kallos, Vol. V, Karger Verlag Basel und New York

OUCHTERLONY, Ö. (1962):

Diffusion-in-gel methods for immunological analysis.

In: Progress in Allergy, eds. Kallos, P. and B. H. Waksman, Vol. VI, Karger Verlag, Basel und New York

PATERSON, W. D., C. GALLANT, D. DESAUTELS and L. MARSHALL (1979):

Detection of bacterial kidney disease in wild salmonids in the Margaree River system and adjacent waters using an indirect fluorescent antibody technique.

J. Fish. Res. Board Can. 36, 1464 - 1468

- PATERSON, W. D., S. P. LALL and D. DESAUTELS (1980):
Bacterial kidney disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Nova Scotia, Canada.
Proc. Spec. Meet. Dis. Comm. Imp. Mar. Fish Shellfish Int. Counc. Exp. Sea, Copenhagen.
- PATERSON, W. D., D. DESAUTELS and J. WEBER (1981 a):
The immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to the causative agent of bacterial kidney disease (*Renibacterium salmoninarum*).
J. Fish Dis. 4, 99 - 111
- PATERSON, W. D., S. P. LALL and D. DESAUTELS (1981 b):
Studies on bacterial kidney disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Canada.
Fish Pathol. 15, 283 - 292
- PETERSON, J. E. (1982):
Analysis of bacterial kidney disease (BKD) and BKD control measures with erythromycin phosphate among cutthroat trout (*Clarki bouvieri*).
Salmonid, 1982, 12 - 15
- PFEIL-PUTZIEN, C., R. HOFFMANN and W. POPP (1985 a):
Preliminary report on the occurrence of BKD in Germany.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 5, 30 - 31
- PFEIL-PUTZIEN, C., R. HOFFMANN, W. POPP und M. SCHAUNER (1985 b):
Zur Verbreitung der bacterial kidney disease (BKD) der Salmoniden in der Bundesrepublik Deutschland.
Zbl. Vet. Med. B 32, 541 - 547

PIPPY, J. H. C. (1969):

Kidney disease in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Magaree River.

J. Fish Res. Board Can. 26, 2535 - 2537

PUTZ, R. E. (1972):

Biological studies on the hemoflagellates *Cryptobia cataractae* and *Cryptobia salmositica*.

Technical Paper 63. Bureau of Sport Fish. and Wildlife, Washington, D. C., U. S. A.

REICHENBACH-KLINKE, H. H. (1966):

Corynebakterien, die Erreger der "kidney disease".
Krankheiten und Schädigungen der Fische
G. Fischer Verlag, Stuttgart / New York

RIJKERS, G. T., E. M. H. FREDERIC-WOLTERS and W. B. VAN MUISWINKEL (1980):

The immune system of cyprinid fish. Kinetics and temperature dependence of antibody-producing cells in carp (*Cyprinus carpio*).

Immunology 41, 91 - 97

ROBBINS, J. und C. A. STETSON (1959):

An effect of antigen-antibody interaction on blood coagulation.

J. Exp. Med. 109, 1 - 9

ROBERTS, R. J., W. M. SHEARER, A.L.S. MUNRO and K. G. R. ELSON (1969):

The pathology of ulcerative dermal necrosis of Scottish salmon.

J. Pathol. 97, 563 - 565

- ROBERTS, R. J. (1978):
The Bacteriology of Teleosts.
In: Fish Pathology, ed. R. J. Roberts, Bailliere
Tindall, London
- ROMEIS, B. (1986):
Mikroskopische Technik.
16. Aufl., R. Oldenbourg Verlag, München, Wien,
- RUBEN, L. N., G. W. WARR, J. M. DECKER and J. J. MARCHALONIS (1977):
Phylogenetic origins of immune recognition: Lymphoid heterogeneity and the hapten / carrier effect in the goldfish, (*Carassius auratus*).
Cell. Immunol. 31, 266 - 283
- RUCKER, R. R., A. F. BERNIER, W. J. WHIPPLE and R. E. BULLOWS (1951):
Sulfadiazine for kidney disease.
Prog. Fish-Cult. 13, 135 - 137
- RUCKER, R. R., B. J. EARP and E. J. ORDAL (1954):
Infectious diseases of Pacific salmon.
Trans. Amer. Fish. Soc. 83, 297 - 312
- SAILENDRI, K. and V. R. MUTHUKKARUPPAN (1975):
The immune response of the teleost, *Tilapia mossambica* to soluble and cellular antigens.
J. Exp. Zool. 191, 371
- SAKAI, M., N. AMAAKI, S. ATSUTA and M. KOBAYASHI (1987 b):
Comparative sensitivities of several dot blot methods used to detect bacterial kidney diseases.
J. Fish Dis. 10, 229 - 231

- SAKAI, M., G. KOYAMA, S. ATSUTA and M. KOBAYASHI (1987 a):
 Detection of *Renibacterium salmoninarum* by a per-
 oxidase-antiperoxidase (PAP) procedure.
 Fish Pathol. 22, 1 - 5
- SANDERS, J. E. and J. L. FRYER (1978):
Corynebacterium salmoninus sp. nov. The causative
 agent of bacterial kidney disease; selected bioche-
 mical properties and pathogenesis in salmonid
 fishes.
 Proc. 3rd Biennial Fish Health Sec. and 9th Annual
 Midwest Fish Dis. Workshops (Kansas City, Mo.,
 U. S. A) 28 - 33
- SANDERS, J. E. and J. L. FRYER (1980):
Renibacterium salmoninarum gen. nov., sp. nov., the
 causative agent of bacterial kidney disease in sal-
 monid fishes.
 Int. J. Syst. Bacteriol. 30, 496 - 502
- SANDERS, J. E., K. S. PILCHER and J. L. FRYER (1978):
 Relation of water temperature to bacterial kidney
 disease in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*),
 sockeye salmon (*O. nerka*) and steelhead trout
 (*Salmo gairdneri*).
 J. Fish Res. Board Can. 35, 8 - 11
- SANDRITTER, W. und C. THOMAS (1981):
 Histopathologie.
 F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, S. 179
- SCHÄPERCLAUS, W. (1979):
 Fischkrankheiten.
 4. Aufl., Akademie Verlag Berlin

- SCHAUNER, M., R. HOFFMANN und C. PFEIL-PUTZIEN (1985):
 Bakterielle Nierenerkrankung der Salmoniden (BKD)
 als Problem der Forellenteichwirtschaft.
 Fischer und Teichwirt 36, 162 - 164
- SCHAUNER, M. (1986):
 Untersuchungen zum serologischen Nachweis der Bakteriellen Nierenerkrankung.
 Vet. -med. Diss., München
- SECOMBES, C. J. and M. J. MANNING (1980):
 Comparative studies on the immune system of fishes and amphibians: antigen localization in the carp, *Cyprinus carpio* L.
 J. Fish Dis. 3, 399 - 412
- SECOMBES, C. J., M. J. MANNING and A. E. ELLIS (1980):
 Antigen-trapping in the carp, *Cyprinus carpio*.
 In: Aspects of developmental and comparative immunology I, ed. J. B. Solomon, Pergamon Press, Oxford
- SECOMBES, C. J. (1986):
 Immunological activation of rainbow trout macrophages induced in vitro by sperm autoantibodies and factors derived from testis sensitised leucocytes.
 Vet. Immunol. Immunopathol. 12, 193 - 201
- SELL, S. (1987)
 Immunology, Immunopathology and Immunity.
 4th Ed. Elsevier, New York. Amsterdam. London
- SHELTON, E. and M. SMITH (1970):
 The ultrastructure of carp (*Cyprinus carpio*) immunoglobulin: a tetrameric macroglobulin.
 J. Mol. Biol. 54, 615 - 617

SMITH, I. W. (1964):

The occurrence and pathology of Dee disease.
Freshwater Salm. Fish. Res. 34, 3 - 9

SMITH, A. M., M. POTTER and E. B. MERCHANT (1967):

Antibody-forming cells in the pronephros of the
teleost *Lepomis macrochirus*.
J. Immunol. 99, 876

SNIESZKO, S. F., P. J. GRIFFIN, H. A. DELISLE, C. H. DUN-
BAR, S. B. FRIDDLE and A. G. SANDERSON (1955):

Kidney disease in brook trout and its treatment.
Prog. Fish-Cult. 17, 3 - 13

SNIESZKO, S. F. (1980):

Epizootologie der Fischkrankheiten.
In: Beiträge zur Fischpathologie und -toxiokologie,
ed. H. H. Reichenbach-Klinke, Gustav Fischer Ver-
lag, Stuttgart

SØLLING, J. (1985):

Circulating immune complexes in patients with glo-
merulonephritis and in renal transplant patients.
Immunocomplex / Glomerulonephritis
Department of Medicine C, Århus Kommunehospital
Århus, Denmark. (Erscheinungsort: Stockholm)

SOLEIM, O. (1985):

Kidney histology of Atlantic salmon (*Salmon salar*)
suffering from cold-warer Vibriosis or Hitra-di-
sease.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 5, 88

STANWORTH, D. R. and M. W. TURNER (1973):

Immunochemical analysis of immunoglobulins and their subunits.

In: Handbook of Experimental Immunology, ed. D. M. Weir, Vol. 1

2. Aufl., Blackwell Scientific Publications, London

STRATTA, P., G. MAZZUCCO, S. GRIVA, C. LETTA and G. MONGA (1988):

Immune-mediated glomerulonephritis after exposure to Paraquat.

Nephron 48, 138 - 141

SUZUMOTO, B. K., C. B. SCHRECK and J. D. MCINTYRE (1977):

Relative resistance of three transferrin genotypes of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and their hematological responses to bacterial kidney disease.

J. Fish Res. Board Can. 34, 1 - 8

TIZARD, I. (1987):

Veterinary Immunology, An Introduction, 3rd Ed.,

W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Sydney, Tokio, Hong Kong. S. 131

WARDLE, C. S. (1971):

New observations on the lymph system of the plaice (*Pleuronectes platessa*) and other teleosts.

J. mar. biol. Ass. U. K. 51 977 - 990

WARREN, J. W. (1963 a):

Kidney disease of salmonid fishes and the analysis of hatchery waters.

Prog. Fish-Cult. 25, 121 - 126

WARREN, J. W. (1963 b):

Toxicity tests of erythromycin thiocyanate in rainbow trout.

Prog. Fish-Cult. 25, 88 - 92

WARREN, J. W. (1983):

Bacterial kidney disease.

In: A guide to integrated fish health management in the great lakes basin, Great Lakes Fishery Commission, Michigan, April, 1983

WEBER, J. M. and B. M. ZWICKER (1979):

Aeromonas salmonicida in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Occurrence of specific agglutinins to three bacterial pathogens.

J. Fish Res. Board Can. 36, 1102 - 1107

WEDEMEYER, G. A. and A. J. ROSS (1973):

Nutritional factors in the biochemical pathology of corynebacterial kidney disease in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*).

J. Fish Res. Board Can. 30, 296 - 298

WEDEMEYER, G. A. (1976):

Physiological response of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to handling and crowding stress in intensive fish cultures.

J. Fish Res. Board Can. 33, 2699 - 2702

WILSON, C. B. and F. J. DIXON (1971):

Quantitation of acute and chronic serum sickness in the rabbit.

J. Exp. Med. 134, 75 - 185

- WILSON, C. B. and F. J. DIXON (1979):
Immunological mechanisms in nephritogenesis.
Hosp. Pract. 14, 57 - 69
- WOLF, K. and C. E. DUNBAR (1959 a):
Methods of infecting trout with kidney disease and
some effects of temperature on experimental infections.
U. S. D. I., Fish. Wildl. Serv. Spec. Sci. Rep.
Fish. No. 286 , 8
- WOLF, K. and C. E. DUNBAR (1959 b):
Test of 34 therapeutic agents for control of kidney
disease in trout.
Trans. Amer. Fish. Soc. 88, 117 - 124
- WOOD, J. W. (1974):
Diseases of pacific salmon, their prevention and
treatment.
Sec. Ed. Wash. Dep. Fish., Hatch Div., p 82
- WOOD, J. W. and E. J. ORDAL (1958):
Tuberculosis in pacific salmon and steelhead trout.
Res. Briefs. Fish. Comm, Oregon 25, 1 - 38
- WOOD, J. W. and J. WALLIS (1955):
Kidney disease in adult chinook salmon and its
transmission by feeding to young chinook salmon.
Res. Briefs Fish. Comm. Oregon 6, 32 - 40
- WOOD, J. W., W. T. YASUTAKE and W. L. LEHMANN (1955):
A mycosis-like granuloma of fish.
J. Infect. Path. 97, 262 - 267
- WOOD, E. M. and W. T. YASUTAKE (1956):
Histopathology of kidney disease in fish.
Amer. J. Path. 32, 845 - 857

- WOODALL, A. N. and G. LAROCHE (1964):
Nutrition of salmonid fishes. XI. Iodine requirements of chinook salmon.
J. Nutr. 83, 475 - 481
- YAMAMOTO, T. (1975):
Infectious pancreatic necrosis virus and bacterial kidney disease appearing concurrently in populations of *Salmo gairdneri* and *Salvelinus fontinalis*.
J. Fish Res. Board Can. 32, 92 - 95
- YASUTAKE, W. T. (1975):
Fish viral diseases: clinical histopathological and comparative aspects.
In: Pathology of fishes, eds: W. E. Ribelin and G. Migaki.
University of Wisconsin Press.
- YOUNG, C. L. and G. B. CHAPMAN (1978):
Ultrastructural aspects of the causative agent and renal histopathology of bacterial kidney disease in brook trout (*Salvelinus fontinalis*).
J. Fish Res. Board Can. 35, 1234 - 1248

Ich danke Herrn Prof. Dr. R. Hoffmann sehr herzlich für die Überlassung des Themas und für seine freundliche Unterstützung bei Erstellung und Korrektur dieser Arbeit.

Frau Dr. C. Pfeil-Putzien danke ich für ihre hilfreiche Betreuung und sachliche Anleitung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Th. Fischer-Scherl für ihre freundschaftliche und stets hilfreiche Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Durchführung und der Auswertung der Elektronenmikroskopie.

Frau B. Klumpp und Frau R. Reitmeier danke ich für die Einweisung in die histologischen bzw. in die bakteriologischen Arbeitsmethoden und Frau S. Friedrich für die Anfertigung der Ultradünnschnitte.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. G. Weiland vom Institut für Parasitologie und Tropenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Universität München für die zur Verfügungstellung des Serums und für seine wertvolle fachliche Beratung.

Herrn Dr. T. Haenichen vom Institut für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München sowie Herrn W. Reichert von der Firma Microm danke ich für die Bereitstellung eines Kryocut-Mikrotoms.

Nicht zuletzt möchte ich auch Herrn W. Busch für die gute Betreuung der Versuchsfische bedanken.

Meinen lieben Freunden und Verwandten gilt ein liebevolles Dankeschön für ihre unermüdliche aufmunternde Unterstützung und zahlreichen Wiederherstellungen meines inneren Gleichgewichts.

LEBENS LAUF

Name: Susanne Ahmed Ali Sami
Geburtsdatum: 25.08.1962
Geburtsort: Shubra / Kairo, Ägypten
Eltern: Prof. Dr. med. vet. A. A. Sami
Hildegard Mertel-Sami, geb. Mertel, Lehrerin
Schulausbildung:
1968 - 1969 Deutsche Schule der Borromaerinnen / Kairo
1969 - 1972 Volksschule Oberschleißheim / München
1972 - 1981 Deutsche Evangelische Oberschule / Kairo
Studium:
1981 - 1986 Veterinärmedizinisches Studium an der Veterinärmedizinischen Fakultät Edfina der Universität Alexandria / Ägypten
26. Mai 1986 Staatsexamen

Promotionsstudium: Ab August 1986 am Institut für Zoologie und Hydrobiologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Deutsche Approbation: 22.10.1987

